

**Untersuchungen zum Zusammenhang
zwischen der Arylsulfatase- und der
Cerebrosidsulfatase-Aktivität
menschlicher Sulfatase A anhand kinetischer
Eigenschaften**

Klaus Stinshoff

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551924_0072

Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen der Arylsulfatase-
und der Cerebrosidsulfatase-Aktivität menschlicher Sulfatase A
anhand kinetischer Eigenschaften

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt von

Klaus Stinshoff

aus

Dortmund



1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Jatzkewitz
Tag der mündlichen Prüfung: 8. Januar 1974

Hildegard, Annette und Hanne Stinshoff gewidmet.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 1969 bis April 1973 in der neurochemischen Abteilung des Max-Planck-Institutes für Psychiatrie ausgeführt.

Meinem verehrten Lehrer,

Herrn Prof. Dr. H. Jatzkewitz,

danke ich herzlich für die Anregung zu dieser Arbeit und für seine großzügige Unterstützung bei ihrer Durchführung.

Herrn Prof. Dr. F. Lynen

danke ich sehr für wohlwollende Förderung.

Mein Dank gebührt auch Herrn Prof. Dr. A. B. Roy, Canberra, für die Überlassung von Sulfatasen A aus den Lebern von Rind und rotem Känguruh und für anregende Diskussionen.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A . EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
I. Einleitung	1
II. Ziel der Arbeit	3
III. Zusammenfassung der bisher bekannten Eigenschaften der Sulfatase A	4
B. HAUPTTEIL: DIE SULFATASE A AUS MENSCHLICHEN GEWEBEN	9
I. Anreicherung	9
II. Abschätzung des Molekulargewichtes bei pH 4,5 und pH 7,5	11
III. Stabilität im pH-Bereich zwischen 3,4 und 7,5	12
IV. Untersuchungen über die Reaktion mit Nitrocatecholsulfat	14
1. Bestimmung einiger Parameter der enzymatischen Reaktion	14
2. pH-Abhängigkeit der Arylsulfatase-Aktivität	17
a. Einfluß der pH-Werte auf die Anfangsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion	18
b. Abhängigkeit der Inaktivierungsgeschwindigkeit vom pH-Wert	21
c. pH-Abhängigkeit des maximalen Umsatzes	21
d. Einfluß der pH-Werte auf die enzymatische Reaktion im pH-Bereich, in dem die Sulfatase A instabil ist	24
e. pH-Profil der Reaktion des durch Sulfat reaktivierten Enzyms	26
f. Wahl des pH-Wertes zur Untersuchung der Wirkung von Substrat-, Puffer- und Enzymkonzentration auf die Arylsulfatase-Aktivität	28
3. Wirkung der Enzym-, Substrat- und Pufferkonzentration auf die Arylsulfatase-Aktivität	28
a. Relation zwischen Enzymkonzentration und den Parametern der enzymatischen Reaktion	28
b. Einfluß der Substratkonzentration	29

	Seite
c. Scheinbare Michaeliskonstante für die enzymatische Reaktion in 0,1 M Natriumformiat-Puffer	31
d. Einfluß der Pufferkonzentration auf die scheinbare Michaeliskonstante	32
e. Inhibitorische Wirkung von Natriumsulfat auf das native Enzym	36
f. Einfluß der Natriumformiat-Konzentration auf die Parameter der enzymatischen Reaktion	37
g. Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion nach Reaktivierung der inaktivierten Sulfatase A durch Sulfat-Ionen in Abhängigkeit von der Pufferkonzentration	38
h. Vergleich der Einflüsse von Natriumformiat, -acetat, -propionat und -chlorid	40
 V. Einfluß von Cerebrosidsulfat auf die Arylsulfataseaktivität	 41
1. Abhängigkeit der Arylsulfatase-Aktivität in Gegenwart und Abwesenheit von Cerebrosidsulfat sowie der Cerebrosidsulfatase-Aktivität von der Pufferkonzentration	42
2. Einfluß von Cerebrosidsulfat auf die Zeit-Umsatz-Kurve der Arylsulfatase-Reaktion	44
3. Hemmung der Arylsulfatase-Aktivität durch Cerebrosidsulfat	46
 VI. Die Cerebrosidsulfatase-Aktivität	 47
1. Substrat zur Bestimmung der Cerebrosidsulfatase-Aktivität	47
2. Bestimmung der Cerebrosidsulfatase-Aktivität	48
3. Zeit-Umsatz-Kurve	48
4. pH-Profil	52
5. Einfluß der Pufferkonzentration	54
6. Relation zwischen Substratkonzentration und enzymatischer Aktivität	55

	Seite
7. Hemmung der Cerebrosidsulfatase-Aktivität durch Natrium-sulfat, Nitrocatecholsulfat und Natriumformiat	57
VII. 1. Vergleich des Einflusses von Lipiden und Proteinen auf die Arylsulfatase- und auf die Cerebrosidsulfatase-Aktivität	59
2. Vergleich der Umsätze in der Arylsulfatase- und in der Cerebrosidsulfatase-Reaktion	61
C. DISKUSSION	63
D. METHODIK UND BESCHREIBUNG DER VERSUCHE	77
I. Anreicherung der Sulfatase A	77
II. Inkubationsbedingungen zur Bestimmung der Arylsulfatase-Aktivität	79
1. Substratlösung	79
2. Pufferlösungen	79
3. Weitere Zusätze zur Inkubationslösung	80
4. Inkubation zur Bestimmung des Umsatzes nach einer bestimmten Inkubationszeit	80
5. Inkubation zur Bestimmung der Zeit-Umsatz-Kurve	80
6. Inkubation zur Bestimmung der Arylsulfatase-Aktivität in Gegenwart von Cerebrosidsulfat	81
7. Kontrolle des pH-Wertes im Inkubationsansatz; Abmessung der Volumina	81
8. Bestimmung des Umsatzes an Nitrocatecholsulfat	82
9. Inkubation nach Baum et al.	82
10. Abweichungen von den Mittelwerten	82
III. Abschätzung des Molekulargewichtes der Sulfatase A bei pH 4,5 und pH 7,5	83

	Seite
IV. Untersuchung zur Beständigkeit der Sulfatase A im pH-Bereich zwischen 3, 4 und 7, 5	83
V. pH-Profil der Reaktion des durch Sulfat reaktivierten Enzyms	84
VI. Das Substrat zur Bestimmung der Cerebrosidsulfatase-Aktivität	84
1. Isolierung von Cerebrosidsulfat aus Rinderhirnen	84
2. Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Cerebrosid und Cerebrosidsulfat	85
3. Lösungsmittel für die katalytische Addition von Tritium an Cerebrosidsulfat	85
4. Katalytische Addition von Tritium an die Doppelbindungen des Cerebrosidsulfates	86
5. Reinigung des tritierten Cerebrosidsulfates und Reinheitskontrolle	86
6. Bestimmung der spezifischen Radioaktivität	87
7. Sitz der Markierung im Gesamtmolekül des Cerebrosidsulfates	87
VII. Radiodünnschichtchromatographische Analyse	88
1. Radiometrische Auswertung der Dünnschichtchromatogramme	88
2. Fehler bei der Auswertung	89
VIII. Inkubationsbedingungen zur Bestimmung der Cerebrosidsulfatase-Aktivität	90
1. Pufferlösungen	90
2. Zusätze zum Inkubationsansatz	90
3. Inkubation zur Bestimmung der Cerebrosidsulfatase-Aktivität	91
E. ZUSAMMENFASSUNG	93
F. LITERATURVERZEICHNIS	99
G. LEBENSLAUF	101

A. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

A I. Einleitung

Die Sulfatase A rechnet man zu einer Gruppe von Enzymen, die auf Grund ihrer Fähigkeiten, phenolische Sulfatester zu spalten, als "Arylsulfatasen" (1) (E.C. 3.1.6.1) bezeichnet wurden. Das Verhalten der Arylsulfatasen gegenüber Sulfat, einem der Produkte der Arylsulfatase-Reaktion, erlaubt eine Unterteilung dieser Gruppe von Enzymen in Arylsulfatasen des Typs 1, die durch Sulfationen nicht oder kaum gehemmt werden, und solche des Typs 2, die durch Sulfationen gehemmt werden (2).

Arylsulfatasen beiden Typs sind in den Geweben vieler Säugetiere und des Menschen nachgewiesen worden, und zwar die Arylsulfatase C als Enzym des Typs 1 und die Arylsulfatasen A und B als solche des Typs 2 (3-6). Die physiologische Funktion dieser Enzyme war, wie die Benennung andeutet, lange unbekannt.

Erst kürzlich konnte die Arylsulfatase C aus Rattenleber als Östrogensulfatase identifiziert werden (7). Es handelt sich bei dieser Sulfatase um ein unlösliches, im mikrosomalen Membransystem lokalisiertes Enzym (8, 9).

Die löslichen Arylsulfatasen A und B sind lysosomalen Ursprungs (10). Vergleiche dieser beiden Sulfatasen aus den Geweben des Menschen (11-14), des Rindes (15, 16) und des roten Känguruhs (17) zeigen generelle Unterschiede: Die B-Enzyme haben mit 45 000 bis 54 000 ein niedrigeres Molekulargewicht als die A-Enzyme mit 100 000 bis 110 000, und ihre isoelektrischen Punkte liegen zwischen pH 7 und 9, während die der A-Enzyme zwischen pH 3,6 und 5,4 liegen. Weiterhin ist der Umsatz phenolischer Sulfatester durch die Arylsulfatase B in der Anfangsphase der Reaktion der Inkubationszeit direkt proportional, wie das bei enzymatischen Reaktionen die Regel ist. Die Zeit-Umsatz-Kurve der Reaktion der A-Enzyme mit ihren Substraten dagegen ist in charakteristischer Weise gekrümmt (18, 19). Diese Krümmung erlaubt keine exakte Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion und führt damit zu erheblichen Schwierigkeiten in der Untersuchung der kinetischen Eigenschaften der Arylsulfatasen A.

Die physiologische Funktion der Arylsulfatase B ist noch nicht eindeutig geklärt, doch deutet der Ausfall des Enzyms bei Patienten mit einem Maroteaux-

Lamy Syndrom, das durch vermehrte Ausscheidung von Chondroitinsulfat B im Urin gekennzeichnet ist, auf seine Rolle im Metabolismus von Sulfatestern der Mucopolysaccharide hin (20).

Auch der erste Hinweis auf die natürlichen Substrate der Arylsulfatase A ergab sich aus Untersuchungen einer menschlichen Krankheit, der metachromatischen Leukodystrophie. Die metachromatische Leukodystrophie ist eine autosomal rezessive Erbkrankheit, in der eine Degeneration des Myelins zum Tode der Patienten führt. Wie Jatzkewitz 1958 erkannte (21), wird die Demyelinisierung durch eine Speicherung von Cerebrosidsulfaten (Ceramidgalaktose-3-sulfaten) bewirkt, die im Gehirn und daneben in den visceralen Organen der Patienten beobachtet wird (21 - 24).

Austin et al. konnten 1963 zeigen, daß die Arylsulfatase A-Aktivität in Geweben von Fällen metachromatischer Leukodystrophie drastisch reduziert ist (25), und damit lag die Vermutung nahe, daß die Speichersubstanzen, Cerebrosidsulfate, auch die natürlichen Substrate der Arylsulfatase A sind.

Voraussetzung für eine Bestätigung dieser Vermutung war der Nachweis eines Cerebrosidsulfat spaltenden Enzyms, der Mehl und Jatzkewitz ebenfalls 1963 (26) mit einer Enzympräparation aus Schweinenieren gelang. In der Folgezeit wurde das Enzym angereichert und charakterisiert (27, 28). Dabei zeigte es sich, daß die Enzympräparation erst dann ihre volle Cerebrosidsulfatase-Aktivität entwickelte, wenn zwei höhermolekulare Fraktionen rekombiniert wurden, die vorher durch Hochspannungselektrophorese grob voneinander getrennt worden waren, und die sich durch ihre Stabilität bei Erhitzen auf 100°C unterschieden. Die hitzelabile Fraktion enthielt Arylsulfatase A-Aktivität, wogegen die hitzestabile Fraktion, die als Komplementär-Fraktion und später als Aktivator-Fraktion bezeichnet wurde, keine eigene enzymatische Aktivität besaß. Diese Fraktion erhöhte jedoch die Cerebrosidsulfatase-Aktivität der Arylsulfatase A etwa um den Faktor 10, während sie die Arylsulfatase-Aktivität nicht beeinflusste (28). Ein entsprechender Aktivator konnte inzwischen auch in normalen menschlichen Geweben und in solchen von Fällen metachromatischer Leukodystrophie nachgewiesen werden (19). Seine Natur und die Art seiner Wirkung sind bisher noch unbekannt.

Die Beobachtung, daß in Fällen von metachromatischer Leukodystrophie nicht nur die Arylsulfatase A - sondern auch die Cerebrosidsulfatase-Aktivität auf

maximal 2% ihrer Aktivität in normalem menschlichen Gewebe erniedrigt ist, die erstmals 1968 von Jatzkewitz und Mehl (30) gemacht und inzwischen mehrfach bestätigt worden ist (14, 31, 32), war ein weiterer Hinweis auf die Identität von Arylsulfatase A und Cerebrosidsulfatase. Darüberhinaus ist in jüngster Zeit auch die Cerebrosidsulfatase-Aktivität einer homogenen Arylsulfatase A aus Rinderleber beschrieben worden (33). Da somit das natürliche Substrat des Enzyms mit hoher Wahrscheinlichkeit kein Arylsulfat ist, erschien es wenig sinnvoll, die Bezeichnung "Arylsulfatase A" beizubehalten, und Jerfy und Roy haben dementsprechend den Namen "Sulfatase A" vorgeschlagen (33), der in dieser Arbeit übernommen wird.

Bisher konnte die Cerebrosidsulfatase-Aktivität der Sulfatase A von Säugetieren allerdings nur in Gegenwart von Aktivatoren wie dem natürlichen Aktivator der Sulfatase A aus Schweinenieren oder von Natriumtaurodesoxycholat im Falle der Sulfatase A aus Rinderleber nachgewiesen werden. Die gleiche Abhängigkeit der Cerebrosidsulfatase-Aktivität von der Anwesenheit von Aktivatoren zeigten rohe Enzympräparationen aus menschlichen Geweben. Als Aktivatoren wurden in diesen Untersuchungen reines (34) und rohes (14) Natriumtaurodesoxycholat sowie reines Natriumcholat (31) angewendet. Gereinigte Sulfatasen A aus menschlichen Geweben sind noch nicht untersucht worden.

Die Tatsache, daß die Sulfatase A nur in Gegenwart von Aktivatoren Cerebrosidsulfatase-Aktivität zeigte, ließ es lange als nicht endgültig gesichert erscheinen, daß Cerebrosidsulfat das natürliche Substrat der Sulfatase A ist. Darüberhinaus erschwerte sie den Vergleich der beiden enzymatischen Aktivitäten des Enzyms, der weiterhin auch dadurch behindert wurde, daß sich die kinetischen Eigenschaften der Arylsulfatase-Reaktion auf Grund der ungewöhnlichen Zeit-Umsatz-Kurve nicht eindeutig ermitteln ließen.

A II. Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Sulfatase A aus menschlichen Geweben anzureichern und zu versuchen, die Anfangsgeschwindigkeit ihrer Arylsulfatase-Reaktion exakt zu bestimmen, um kinetische Daten für diese Reaktion überprüfen zu können. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob die Sulfatase A auch in Abwesenheit von Aktivatoren Cerebrosidsulfatase-Aktivität zeigt, um die Frage nach der Identität von Arylsulfatase A und Cerebrosid-

sulfatase weiter klären zu können. Die Cerebrosidsulfatase-Aktivität in Abwesenheit von Aktivatoren sollte gegebenenfalls untersucht werden, um aus dem Vergleich der kinetischen Eigenschaften der Arylsulfatase- und der Cerebrosidsulfatase-Reaktion Aufschlüsse über den Zusammenhang zwischen beiden enzymatischen Aktivitäten der Sulfatase A zu bekommen.

Diese Untersuchungen wurden nicht zuletzt als Voraussetzung dafür angesehen, zukünftige Arbeiten über den Wirkungsmechanismus des natürlichen Aktivators oder der Detergentien bei der Katalyse des Abbaus von Cerebrosidsulfat zu ermöglichen.

A III. Zusammenfassung der bisher bekannten Eigenschaften der Sulfatase A

Die physikalischen und katalytischen Eigenschaften der Sulfatase A sollen zunächst am Beispiel des Enzyms aus Rinderleber, das bisher am weitesten untersucht worden ist (15), erläutert werden:

Das Enzym hat ein Molekulargewicht von 107 000. Es besteht aus vier Untereinheiten, von denen wahrscheinlich je zwei identisch sind. Die Spaltung der Sulfatase A in Untereinheiten, die mit einer irreversiblen Zerstörung ihrer enzymatischen Aktivität verbunden ist, wird durch Behandlung des Enzymproteins mit 0,02% Natriumdodecylsulfat bzw. 8 M Harnstoff und 6 mM Dithiothreitol erreicht.

Bei pH-Werten unter 6,5 zeigt das Enzym eine Tendenz zu polymerisieren, die durch Erhöhung der Proteinkonzentration und der Ionenstärke des Puffers gefördert wird. Bei pH-Werten unter 5,5, einer Ionenstärke von 0,1 M und Proteinkonzentrationen über 0,05 mg/ml liegt es vollständig als Tetrameres mit einem Molekulargewicht von 411 000 vor. Die Polymerisation wird auf hydrophobe Wechselwirkungen zurückgeführt.

Bei Proteinkonzentrationen unter 0,05 mg/ml depolymerisiert die tetramere Sulfatase A auch bei pH-Werten zwischen 4 und 5,5, und bei Konzentrationen von 0,001 bis 0,03 mg/ml, bei denen die enzymatische Aktivität normalerweise gemessen wird, liegt sie als Gemisch aus niederen Oligomeren und Monomeren vor.

Nähert sich der pH-Wert dem isoelektrischen Punkt der Sulfatase A (pH 3,4), so zerfällt das Enzym in kleinere, heterogene Bruchstücke und seine Aktivität wird irreversibel zerstört.

Die Spezifität des Enzyms gegenüber Arylsulfaten ist nicht sehr ausgeprägt. Es werden unter Spaltung der O-S Bindung (35) substituierte und unsubstituierte Phenyl-, Naphthyl-, Phenanthryl- und Pyridylsulfate gespalten, allerdings mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Auch die Affinität dieser Substrate zur Sulfatase A ist sehr unterschiedlich: Die scheinbaren Michaeliskonstanten reichen von 310 mM für Phenylsulfat bis 0,47 mM für 2-Hydroxy-5-nitrophenylsulfat (Nitrocatecholsulfat; NCS). Steroidsulfaten und den strukturellen Analoga der Arylsulfate, nämlich Arylcarbonaten, -sulfonaten, -thiosulfaten und -sulfamaten gegenüber ist das Enzym inaktiv.

Mit Nitrocatecholsulfat, also dem Substrat, das von den bisher geprüften Arylsulfaten die höchste Affinität zur Sulfatase A hat, sind die kinetischen Eigenschaften des Enzyms untersucht worden. Dabei zeigte es sich, daß Sulfat und Sulfid Ionen die enzymatische Aktivität mit K_i -Werten von 0,15 mM und 0,002 mM kompetitiv hemmen, während 2-Hydroxy-5-nitrophenol (Nitrocatechol; NC) bis zu einer Konzentration von 10 mM keinen signifikanten Einfluß ausübt. Das pH-Optimum wird mit 5 bis 5,5 angegeben, seine Lage wechselt aber mit den Inkubationsbedingungen.

Als reaktive Gruppen im aktiven Zentrum der Sulfatase A werden Tyrosyl- und Histidyl-Gruppen vermutet, doch lassen die bisherigen Untersuchungen noch keine definitiven Schlüsse auf die reaktiven Gruppen zu.

Die auffälligste Eigenschaft des Enzyms aber ist die Tatsache, daß es während der Reaktion mit Arylsulfaten fortschreitend inaktiviert wird. Diese Inaktivierung erfolgt nur in Gegenwart der Substrate; Vorinkubation des Enzyms mit Puffer oder mit den Produkten der enzymatischen Hydrolyse verändert die Aktivität des Enzyms nicht. Die inaktivierte Enzymspecies kann durch Acetonfällung oder Sephadex Filtration aus dem Inkubationsansatz isoliert werden. Sie zeigt das gleiche Molekulargewicht und Polymerisationsverhalten wie die aktive Form des Enzyms. In Gegenwart von Sulfat, Phosphat, Pyrophosphat und, in geringerem Maße, Nitrocatechol hydrolysiert auch die inaktivierte Form der Sulfatase A Nitrocatecholsulfat und Nitrophenylsulfat, und zwar mit konstanter Geschwindigkeit, die allerdings weit unter der des nativen Enzyms

liegt. Bei höheren Substratkonzentrationen wird in dieser Reaktion, im Gegensatz zur Reaktion der nativen Sulfatase A, Substrathemmung beobachtet, deren Modus auf einen inaktiven Komplex aus Enzym- und zwei Substratmolekülen schließen läßt (36). Die Art der Abhängigkeit dieser Reaktion von der Reaktivorkonzentration legt die Vermutung nahe, daß ein Reaktivator-Enzym-Substrat-Komplex in diesem Fall die aktive Species ist.

Die Zugabe von Sulfat Ionen zur inaktivierten Sulfatase A führt nicht bei allen Substraten zu einer Reaktivierung, wie ihre Reaktion mit 4-Methylumbelliferyl-sulfat zeigt. Die langsame Inaktivierung des Enzyms tritt jedoch auch bei seiner Reaktion mit diesem Substrat auf (13).

Durch Inkubation in neutralen Puffern bei 37°C und in Abwesenheit von Substraten wird das inaktive Enzym langsam wieder in die native Form überführt. Diese Umwandlung hat eine Halbwertszeit von etwa 4 h, sie wird durch die Anwesenheit der Reaktivatoren nicht beschleunigt.

Zur Erklärung dieser Phenomäne wurde die Hypothese aufgestellt, daß die Sulfatase A während ihrer Reaktion mit Arylsulfaten durch Konformationsänderung langsam eine zweite Bindungsstelle entfaltet, die sowohl Substrat als auch, in Konkurrenz zum Substrat, Phosphat, Pyrophosphat und die Reaktionsprodukte binden kann. Die Bindung von Substrat an das so modifizierte Enzym ergibt einen inaktiven Komplex, während das modifizierte Enzym aktiv ist, wenn die Phosphate oder Reaktionsprodukte gebunden werden. Genauere Vorstellungen über die Art der Reaktion, die zum modifizierten Enzym führt, sind noch nicht entwickelt worden. Mit Sicherheit aber steht diese Reaktion in keinem Zusammenhang mit dem Polymerisationsverhalten der Sulfatase A, wie ursprünglich vermutet worden ist (37), da die modifizierte Enzymspezies das gleiche Molekulargewicht und Polymerisationsverhalten wie das native Enzym zeigt, und da die Sulfatase A aus Känguruhleber, die nicht polymerisiert und nur als Monomeres vorliegen kann, ebenfalls in ihrer Reaktion mit Arylsulfaten inaktiviert wird (17).

Die Inaktivierung wurde bei allen Sulfatasen A aus Säugetiergeweben, die bisher näher untersucht worden sind, und bei der Sulfatase A aus dem Gehirn des Huhns, der einzigen untersuchten Wirbeltierspecies, die nicht zu den Säugern gehört, beobachtet (6, 13, 14, 17, 18, 19, 38). Das Modell der enzymatischen Reaktion der Sulfatase A ist zuerst von Baum und Dodgson (19) für das mensch-

liche Enzym entwickelt worden. Es wurde erst später für das Enzym aus Rinderleber übernommen (39).

Die Inaktivierung des Enzyms in seiner Reaktion mit Arylsulfaten führt zu der schon erwähnten charakteristischen Krümmung der Zeit-Umsatz-Kurve dieser Reaktion, die es unmöglich macht, die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion der Sulfatase A exakt zu bestimmen. In Arbeiten, die bisher über die kinetischen Eigenschaften der Sulfatasen A erschienen sind, wurde diese Schwierigkeit umgangen, indem der Umsatz an Substrat nach einer bestimmten Inkubationszeit gemessen und als Geschwindigkeit der Quotient aus Umsatz und Inkubationszeit angenommen wurde. Lediglich Roy und seine Arbeitsgruppe bestimmten die Geschwindigkeit nach einminütiger Inkubation durch Anlegen der Tangente an die Zeit-Umsatz-Kurve im Zeitpunkt eine Minute. Es ist klar, daß dieses Verfahren keine Rückschlüsse auf die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion und damit auf die Reaktionsgeschwindigkeit des nativen Enzyms erlauben, und daß kinetische Daten, die anhand dieser Methoden bestimmt worden sind, nicht für das native Enzym gelten können.

Die Zeit-Umsatz-Kurve der Arylsulfatase-Reaktion der menschlichen Sulfatase A läßt sich nach Baum et al. (40) durch Inkubation des Enzyms in 0,01 M Nitrocatecholsulfat, $5 \cdot 10^{-4}$ M Natriumpyrophosphat, 10% Natriumchlorid (Gew./Vol.) und 0,5 M Natriumacetat, pH 5,0, weitgehend "normalisieren". Diese "Normalisierung" ist auf eine Überlagerung hemmender und aktivierender Effekte auf die Reaktionen der nativen und der modifizierten Formen des Enzyms zurückzuführen (14). Die Inkubationslösung nach Baum et al. eignet sich wegen der Komplexität der Effekte auf keinen Fall für kinetische Untersuchungen, sie vereinfacht jedoch den Vergleich der Aktivität verschiedener Sulfatase A-Präparationen untereinander.

Die Cerebrosidsulfatase-Aktivität der Sulfatase A wurde zuerst von Mehl und Jatzkewitz an einer Enzympräparation aus Schweinenieren erkannt (28). Die Eigenschaften der Cerebrosidsulfatase-Reaktion des Enzyms wurden in Gegenwart des natürlichen Aktivators, dessen isoelektrischer Punkt mit pH 4,2 etwas unter dem der Sulfatase A mit pH 4,4 liegt (41), untersucht:

In Gegenwart des Aktivators zeigt die Reaktion ein pH-Optimum von pH 4,5, die scheinbare Michaeliskonstante ist etwa 0,1 mM, und Sulfit-, Phosphat-, Pyrophosphat- und Sulfat-Ionen wirken wie in der Arylsulfatase-Reaktion hemmend

(27). Galaktose-3-sulfat wird hydrolisiert, wenn auch mit erheblich niedrigerer Geschwindigkeit als das natürliche Substrat, während Cerebrosid- und Galaktose-6-sulfat nicht abgebaut werden. Diese Substanzen hemmen jedoch die Cerebrosidsulfatase- und Arylsulfatase-Aktivität des Enzyms (28).

In letzter Zeit sind auch die Cerebrosidsulfatase-Aktivitäten einer hochgereinigten Sulfatase A aus Rinderleber (33) und von rohen Enzympräparationen aus menschlichen Geweben (14, 31, 34) untersucht worden. Als Aktivatoren wurden in diesen Fällen reines (33, 34) und rohes (14) Natriumtaurodesoxycholat sowie reines Natriumcholat (31) verwendet. Auch in diesen Untersuchungen lag das pH-Optimum bei pH 4,5. Die scheinbaren Michaeliskonstanten lagen, je nach Inkubationsbedingungen, zwischen 0,04 und 0,3 mM. Die Hemmung durch Sulfat wurde als nicht-kompetitiv erkannt (33, 34). Die Zeit-Umsatz-Kurve der Cerebrosidsulfatase-Reaktion wurde nur in drei Fällen untersucht (14, 33, 34). Sie war, wie die entsprechende Kurve der Arylsulfatase-Reaktion, nicht linear, doch wird diese Anomalie von Jerfy und Roy (33) nicht auf die Inaktivierung des Enzyms durch sein Substrat, sondern auf die Reduktion der Substratkonzentration und auf eine von der Anwesenheit des Substrats unabhängige Denaturierung des Enzyms im Inkubationsansatz zurückgeführt.

B. HAUPTTEIL: DIE SULFATASE A AUS MENSCHLICHEN GEWEBEN

I. Anreicherung

Die Sulfatase A wurde zunächst aus menschlichen Nieren, später aus menschlichen Lebern isoliert. Der Aufarbeitungsgang war für beide Organe der gleiche, er gliederte sich in sieben Schritte, die in Tabelle I wiedergegeben sind.

Tabelle I

Anreicherung der Sulfatase A aus menschlichen Nieren und Lebern. Einzelheiten siehe Methodik. Die enzymatische Aktivität wurde nach Baum et al. (40) bestimmt; eine Enzymeinheit ist die Enzymmenge, die bei 37°C 1 μ Mol NCS / min hydrolysiert. Protein wurde nach Lowry et al. (42) und im Schritt 5 nach Warburg und Christian (43) bestimmt.

Schritt	Vol. (ml)	Ges.- enzym- einhei- ten (U)	Ges.- pro- tein (mg)	spez. Aktivi- tät (mU/mg Protein)	% d. Aus- gangs- aktivi- tät	Anrei- cherung
1. Homoge- nat	4000	148	18974	7,8	100	1
2. Aceton- fällung	100	177	1566	113	120	14
3. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - Fällung	30	145	340	426	98	54
4. Sephadex G 200, pH 8	100	92	41,3	2230	62	286
5. Elektro- fokus- sierung	30	53	11,5	4628	36	593
6. Sephadex G 200, pH 4,5	30	27	2,23	12096	18	1550
7. DEAE- Cellulose	10	16	0,53	30127	11	3862

Die Anreicherung des Enzyms lehnt sich an entsprechende Arbeitsvorschriften für die Isolierung der Sulfatase A aus Rinderleber (44) und aus Rinderhirn (45) an.

Wie das Enzym aus Rinderorganen läßt sich auch die menschliche Sulfatase A mit Aceton und Ammonsulfat ausfällen (Schritt 2 und 3). Bei der Gelfiltration an Sephadex G 200 (Schritt 4 und 6) wurde die Eigenschaft der Sulfatase A, bei Natriumacetat-Konzentrationen größer als 0,1 M unterhalb von pH 5,5 als Oligomeres und oberhalb von pH 6,5 als Monomeres mit einem Molekulargewicht von etwa 107 000 zu existieren (46), ausgenutzt (siehe auch Abs. B II). Entsprechend war das Eluationsvolumen bei identischen Säulendimensionen bei pH 8 etwa 390 und bei pH 4,5 etwa 280 ml.

Das gereinigte Enzym kann nur unter großen Verlusten elektrofokussiert werden (47; und A.B. Roy, persönliche Mitteilung), während diese Verluste bei der Elektrofokussierung roher Enzympräparationen nicht auftreten. Sie sind möglicherweise auf die Instabilität des Enzyms bei niedrigen pH-Werten zurückzuführen. Die offensichtliche Schutzwirkung der Fremdproteine (siehe Abs. B III) wird, zumindest zum Teil, auch von Triton X-100 ausgeübt (Tab. II), so daß das Enzym auch bei einer spezifischen Aktivität von über 2 U/mg in Gegenwart von 0,1% Triton X-100 ohne zu große Verluste elektrofokussiert werden konnte (Schritt 5). Es zeigte dabei, wie bei der Elektrofokussierung roher Enzympräparationen, einen isoelektrischen Punkt von pH 4,6. Die Proteinbestimmung nach diesem Schritt war problematisch, da Ampholine die Proteinbestimmung nach Lowry et al. (42) stören, während Triton X-100 bei 280 nm absorbiert. Diese Schwierigkeit wurde dadurch umgangen, daß der Proteingehalt der Fraktionen nach der Elektrofokussierung durch Messung der Extinktion bei 280 nm (43) gegen eine 0,1% Triton X-100-Lösung als Blindwert bestimmt wurde.

Verluste traten auch auf, wenn das gereinigte Enzym über Sephadex G 200-Säulen filtriert wurde. Daher wurde auch Schritt 6 in Gegenwart von 0,1% Triton X-100 durchgeführt, was zu einer Verminderung des Verlustes führte.

Die Entfernung des Triton X-100 und eine weitere Anreicherung wurden durch die abschließende Ionenaustauscher-Chromatographie an DEAE-Cellulose erreicht (Schritt 7).

Die Reinheit des Enzyms wurde durch Elektrophorese an 7,5% Standard-Gel in 0,005 M Tris-Glycin-Puffer, pH 8,3, mit einer Stromstärke von 5 mA für 1h überprüft. Nach der Elektrophorese war nur eine Proteinbande erkennbar, in der auch die enzymatische Aktivität lokalisiert war.

B II. Abschätzung des Molekulargewichtes bei pH 4,5 und pH 7,5

Das Molekulargewicht der Sulfatase A bei verschiedenen pH-Werten wurde anhand der Dünnschicht-Gelchromatographie überprüft (48). Bei dieser Methode werden die Wanderungsstrecken von Cytochrom C, von Eichproteinen und des Enzymproteins auf einer mit Sephadex G 200 superfine beschichteten Dünnschichtplatte bestimmt. Die R_{cyt} -Werte erhält man durch Division der Wanderungsstrecken der einzelnen Proteine durch die des Cytochroms C. Die graphische Darstellung der R_{cyt} -Werte gegen den dekadischen Logarithmus der

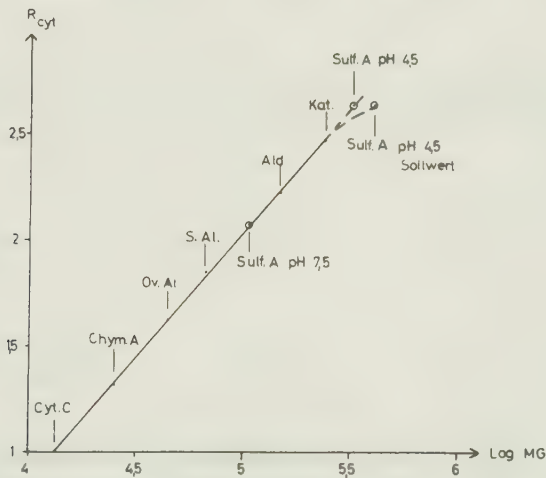


Abb. 1: Eichkurve für die Molekulargewichtsbestimmung der Sulfatase A durch Dünnschicht-Gelchromatographie an Sephadex G 200 superfine in 0,1 M Natriumformiat-Puffer, pH 4,5, und 0,1 M Imidazol-Salzsäure-Puffer, pH 7,5. Ordinate: R_{cyt} -Werte; Abszisse: Dekadischer Logarithmus des Molekulargewichtes (Log MG). Cyt. C: Cytochrom C; Chym. A: Chymotrypsinogen A; Ov. Al.: Ovalbumin; S. Al.: Serum-Albumin; Sulf. A: Sulfatase A; Ald.: Aldolase; Kat.: Katalase.

Molekulargewichte der Proteine ergibt eine Gerade, mit der sich das Molekulargewicht des Enzymproteins abschätzen läßt. Da die Ausschlußgrenze von Sephadex G 200 bei etwa 240 000 liegt, konnte nur festgestellt werden, daß das Molekulargewicht der Sulfatase A bei pH 4,5 über 240 000 beträgt, während es bei pH 7,5 zwischen 100 000 und 110 000 liegt (Abb. 1). Das Ergebnis deckt sich mit an der Sulfatase A aus Rinderleber erhobenen Befunden von Nichol und Roy (46), die mit Hilfe der Ultrazentrifugation das Molekulargewicht zu 107 000 (pH 7,5) und 411 000 (pH 4,5) bestimmt haben.

B III. Stabilität im Bereich zwischen pH 3,4 und 7,5

Die Sulfatase A verliert bei niedrigen pH-Werten ihre Aktivität, und zwar um so schneller, je niedriger der pH-Wert des Inkubationspuffers ist (Abb. 2). Dieser Aktivitätsverlust ist irreversibel, er konnte weder durch Zugabe von

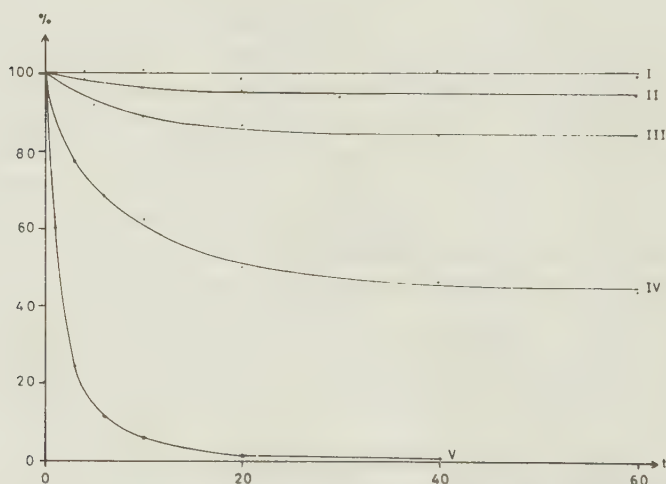


Abb. 2: Aktivitätsverlust der Sulfatase A bei niedrigen pH-Werten.

Ordinate: Prozentsatz der Ausgangsaktivität, %; Abszisse: Inkubationszeit in Abwesenheit von Substrat t (min). Inkubationsbedingungen: 12,5 $\mu\text{g/ml}$ Protein; 0,4 M Natriumformiat, pH-Werte: I = 5,42; II = 5,02; III = 4,56; IV = 4,19; V = 3,62. Der Prozentsatz der Ausgangsaktivität wurde durch 5 min Inkubation bei pH 5,3, Substratkonzentration: 5mM, bestimmt.

Sulfat, das das substratinaktivierte Enzym reaktiviert, noch durch Inkubation in Natriumformiat-Puffer, pH 6, und Imidazol-Salzsäure-Puffer, pH 7 und 8, bei 37°C für 24 h, Bedingungen also, unter denen die Substratinaktivierung des Enzyms rückgängig gemacht wird (39), aufgehoben werden. Es ist demnach anzunehmen, daß das Enzymprotein bei niedrigen pH-Werten denaturiert wird.

Im alkalischen Bereich wurde die Stabilität des Enzyms bis pH 7,5 überprüft, ohne daß ein Aktivitätsverlust nachgewiesen werden konnte.

Tabelle II

Halbwertszeit der Denaturierung der Sulfatase A in Natriumformiat-Puffern verschiedener Molarität und pH-Werte und in Anwesenheit von Rinder-Serumalbumin und Triton X-100. Die Halbwertszeiten wurden aus der graphischen Darstellung der Abhängigkeit der Restaktivität von der Inkubationszeit (Abb. 3 und analoge Darstellung) abgeschätzt. Weitere Einzelheiten siehe methodischer Teil.

Molarität des Puffers (M)	pH	Halbwertszeit der Denaturierungsreaktion (min)
0,8	3,95	4,1
0,4	3,62	1
0,1	3,37	0,9
0,1 + 500 µg/ml Rinder-Serum- Albumin	3,37	3,5
0,1 + 0,1% Triton X-100	3,37	2,0

Für die Geschwindigkeit der Denaturierung sind neben dem pH-Wert auch die Molarität des Puffers und die Anwesenheit von Fremdproteinen oder Detergentien maßgebend. Dabei steigt die Instabilität des Enzyms mit wachsender Pufferstärke, während die Denaturierung durch die Anwesenheit von Albumin oder Triton X-100 verlangsamt wird (Tab. II; Abb. 5a - c).

B IV. Untersuchungen über die Reaktion mit Nitrocatecholsulfat

Die Untersuchungen wurden in der Regel in Gegenwart von Natriumformiat als Puffer durchgeführt. Dieser Puffer wurde Natriumacetat, das bei bisherigen Untersuchungen der Sulfatase A als Puffer verwendet wurde, vorgezogen, da die Inaktivierung des Enzyms in Formiat langsamer verläuft, und da Formiat die enzymatische Aktivität weniger hemmt als Acetat (vergl. Abs. B IV 3 h).

B IV 1. Bestimmung einiger Parameter der enzymatischen Reaktion

Wie schon in der Einleitung dargestellt, sinkt die Aktivität des Enzyms während der Inkubation fortlaufend ab. Der Aktivitätsverlust ist reversibel. Er kann darüberhinaus durch den Einfluß u. a. von Sulfat teilweise wieder aufgehoben werden (19, 39).

Diese Anomalie erschwert die Untersuchung der Kinetik der Sulfatase A erheblich, da damit die Anfangsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion nicht genau bestimmbar ist. Eine Bestimmung dieses und anderer Reaktionsparameter wird jedoch durch die Definition der mathematischen Beziehung zwischen Inkubationszeit und enzymatischer Aktivität ermöglicht.

Graphische Auswertungen der Relation zwischen Inkubationszeit (t) und Umsatz (u) des Enzyms ergeben lineare Beziehungen, wenn der Reziprokwert des Umsatzes gegen den Reziprokwert der Inkubationszeit aufgetragen wird (Abb. 3). Die Zeit-Umsatz-Relation wird daher durch Gleichung I beschrieben:

$$\frac{1}{u} = A + B \frac{1}{t} \quad (\text{I})$$

wobei A durch den Ordinatenabschnitt und B durch die Steigung der Geraden gegeben sind. Die Konstante A kann durch Einführen der Grenzbedingungen $\lim_{t \rightarrow \infty}$ bestimmt werden:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \frac{1}{u} = \lim_{t \rightarrow \infty} \left(A + B \frac{1}{t} \right) = A \quad (\text{II a})$$

Bei unendlicher Inkubationszeit erreicht der Umsatz, sofern das Enzym nicht reaktiviert wird, seinen Maximalwert $U_{\max}$ (nMol NC/ μ g Protein), so daß sich aus Gleichung II a

$$A = \frac{1}{U_{\max}} \quad (\text{II b})$$

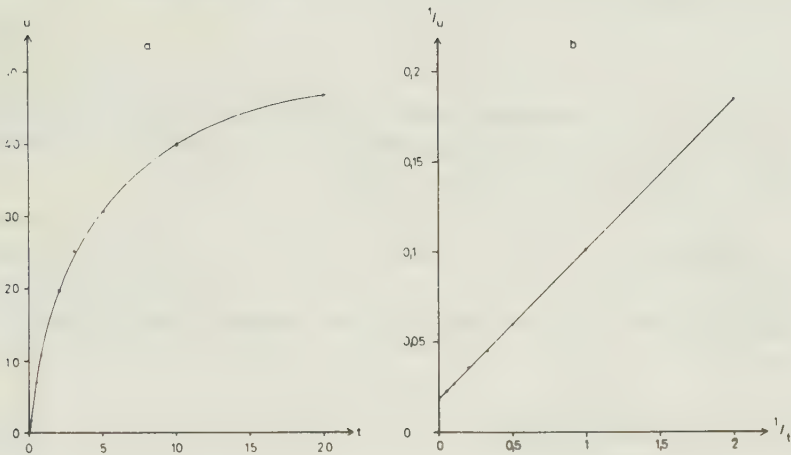


Abb. 3a: Zeit-Umsatz-Kurve der Arylsulfatase-Reaktion der Sulfatase A. Ordinate: Umsatz u (nMol NC / μg Protein); Abszisse: Inkubationszeit t (min). Inkubationsbedingungen: 1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Protein; 5 mM NCS; 0,1 M Natriumformiat, pH 5,3. Der Umsatz nach 20 min entspricht 1,2%, der maximale Umsatz (siehe Abs. B IV 1) 1,4% des eingesetzten Substrates.

Abb. 3b: Doppelt reziproke Darstellung der Kurve in Abb. 3a.

ergibt. Um die Konstante B zu bestimmen, wird Gleichung I nach u aufgelöst:

$$u = \frac{t}{At + B} \quad (\text{III a})$$

nach t differenziert, und der Grenzwert $\lim_{t \rightarrow 0}$ des Differenzialquotienten $\frac{du}{dt}$ gebildet:

$$\lim_{t \rightarrow 0} \frac{du}{dt} = \lim_{t \rightarrow 0} \left(\frac{t}{At + B} \right) dt = \lim_{t \rightarrow 0} \frac{At + B - At}{(At + B)^2} \quad (\text{III b})$$

Der Differentialquotient $\frac{du}{dt}$ gibt die Steigung der Zeit-Umsatz-Kurve und damit die augenblickliche Geschwindigkeit v (nMol NC / μg Protein min) der Reaktion

in jedem Punkte t an. Im Punkte $t = 0$ handelt es sich dabei natürlich um die Anfangsgeschwindigkeit V_o der enzymatischen Reaktion, und damit ergibt sich:

$$B = \frac{1}{V_o} \quad (\text{III c})$$

Damit lassen sich Anfangsgeschwindigkeit und maximaler Umsatz der enzymatischen Reaktion aus der doppelt reziproken Zeit-Umsatz-Kurve ermitteln. Aus den Gleichungen I, II b und III c folgt

$$u = \frac{U_{\max} V_o t}{U_{\max} + V_o t} \quad (\text{IV})$$

als Beziehung für die Zeit-Umsatz-Kurve der Sulfatase A, und aus den Gleichungen III b, II a und III c

$$\frac{du}{dt} = v = \frac{U_{\max}^2 V_o}{(U_{\max} + V_o t)^2} \quad (\text{V})$$

als Relation zwischen der Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion und der Inkubationszeit.

Die Halbwertszeit $t_{1/2}$ (min), in der die Reaktionsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion auf die Hälfte ihres Anfangswertes abfällt, wird wie folgt berechnet:

$$\frac{V_o}{2} = \frac{U_{\max} V_o t_{1/2}}{(U_{\max} + V_o t_{1/2})^2}$$

$$t_{1/2} = 0,414 \frac{U_{\max}}{V_o} \quad (\text{VI})$$

Die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit ist der Abnahme der Konzentration an aktivem Enzym im Inkubationsansatz proportional. Die Halbwertszeit der Reaktionsgeschwindigkeit sollte deshalb ein Maß für die Geschwindigkeit sein, mit der das Enzym inaktiviert wird.

Die oben aufgestellten Beziehungen zwischen Umsatz bzw. Reaktionsgeschwindigkeit und Inkubationszeit gelten nur, wenn die Aktivitätsänderung des Enzyms allein auf die Einwirkung seines Substrates zurückzuführen ist. Wird die en-

zymatische Aktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit zusätzlich durch andere Faktoren beeinflusst, so zeigt die doppelt reziproke Zeit-Umsatz-Kurve Abweichungen von der Linearität. Faktoren dieser Art sind die Denaturierung des Enzyms durch niedrige pH-Werte (Abs. B III), die Rückwandlung des inaktivierten Enzyms in die aktive Form in neutralen Puffern, und die Wiederaufnahme der hydrolytischen Reaktion durch das inaktivierte Enzym unter dem Einfluß von Sulfat-Anionen. Die beiden letzten Faktoren sind jedoch weitgehend ohne Einfluß auf die Reaktion der Sulfatase A in den ersten 10 bis 20 min, die der Bestimmung der Reaktionsparameter zugrunde gelegt wurde, da die Rückwandlung eine Halbwertszeit von 4 h hat (39), und da die durch Hydrolyse von Substrat entstandene Sulfatkonzentration im Meßzeitraum $6 \mu\text{M/L}$ nicht überschritt. Sulfatkonzentrationen in dieser Höhe haben noch keinen meßbaren Einfluß auf das inaktivierte Enzym (39).

Die Gültigkeit der Beziehung zwischen Umsatz und Inkubationszeit ist inzwischen auch für die Reaktion der Sulfatase A aus Rinderleber mit Nitrocatecholsulfat bestätigt worden (33).

Da die Bestimmung der Reaktionsparameter durch die graphische Auswertung der doppelt reziproken Zeit-Umsatz-Kurve recht zeitaufwendig ist, wurden in einigen Fällen Endpunktsbestimmungen nach 1, 5 oder 10 min Inkubationszeit durchgeführt.

B IV 2. pH-Abhängigkeit der Arylsulfatase-Aktivität

Die pH-Abhängigkeit der Arylsulfatase-Aktivität der Sulfatase A wurde in 0,8 M, 0,4 M und 0,1 M Natriumformiat bzw. Imidazol-Salzsäure-Puffer im pH-Bereich zwischen 3,37 und 7,26 geprüft. Die Anfangsgeschwindigkeit und der maximale Umsatz der enzymatischen Reaktion wurden nach der in Abs. B IV 1 beschriebenen Methode bestimmt. Diese Methode ließ sich nur für Inkubationen bei pH-Werten größer als 3,7 anwenden. Bei niedrigeren pH-Werten ergab die doppelt reziproke Darstellung der Zeit-Umsatz-Kurve auf Grund der Denaturierung des Enzyms keine Gerade. Auf dieses Problem wird in Abs. B IV 2 d näher eingegangen.

B IV 2 a. Einfluß der pH-Werte auf die Anfangsgeschwindigkeit
der enzymatischen Reaktion

Als pH-Optimum einer enzymatischen Reaktion ist der pH-Wert anzusehen, bei dem die Reaktion die höchste Anfangsgeschwindigkeit zeigt. Das pH-Optimum der Sulfatase A liegt demnach je nach Pufferkonzentration bei pH 6,2 bis 6,9 (Abb. 4a - c). Mit steigendem pH-Wert nimmt die Anfangsgeschwindigkeit langsam zu und fällt bei pH-Werten, die größer als das Optimum sind, rasch ab. Dieser Kurvenverlauf ist in 0,1 M Puffer am deutlichsten ausgeprägt. Gleichzeitig zeigt ein Vergleich des Kurvenverlaufs bei Inkubationen in 0,1 M, 0,4 M und 0,8 M Puffer, daß die Werte sowohl des pH-Optimums als auch der effektiven Anfangsgeschwindigkeit mit steigender Pufferkonzentration niedriger werden. Der Wechsel von Natriumformiat- zu Imidazol-Salzsäure-Puffer wirkt sich in einer leichten Erhöhung der Anfangsgeschwindigkeit aus.

Als pH-Optimum der menschlichen Sulfatase A sind bisher Werte zwischen pH 4,5 und pH 5,2 angegeben worden (47, 49, 50). Zu diesen Angaben wurden die enzymatischen Aktivitäten durch Bestimmungen des Umsatzes nach 10 (49)

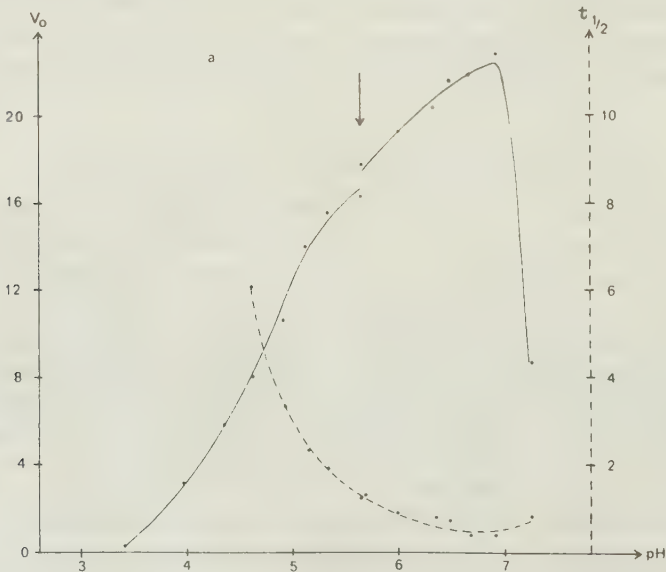


Abb. 4 a

bis 60 min (47) Inkubationszeit ermittelt. Die Untersuchungen gingen demnach davon aus, daß die Geschwindigkeit, mit der die Sulfatase A durch ihr Substrat inaktiviert wird, unabhängig vom pH-Wert ist. Das ist, wie im nächsten Absatz dargestellt, durchaus nicht der Fall, und die Differenz der in der Literatur veröffentlichten Werte des pH-Optimums zueinander und zu den hier angegebenen findet ihre Erklärung in der Abhängigkeit der Inaktivierungsgeschwindigkeit vom pH-Wert.

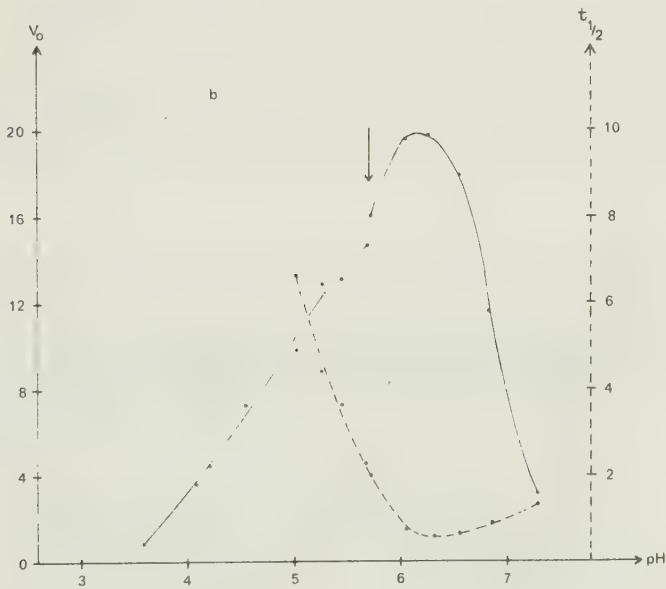


Abb. b

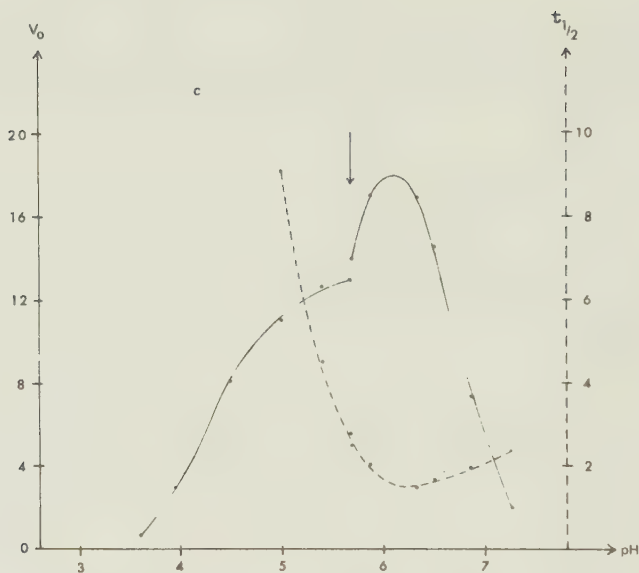


Abb. 4a - c: Halbwertszeit und Anfangsgeschwindigkeit der Arylsulfatase-Reaktion der Sulfatase A in Abhängigkeit vom pH-Wert. Ordinate: Halbwertszeit $t_{1/2}$ (min) (-----) bzw. Anfangsgeschwindigkeit V_0 (nMol NC / μ g Protein · min) (—); Abszisse: pH. Pfeil: Pufferwechsel. Puffer: Unterhalb pH 5, 7: Natriumformiat, oberhalb pH 5, 7: Imidazol-Salzsäure. Inkubationsbedingungen: 1, 25 μ g/ml Protein; 5 mM NCS; Pufferkonzentration: Abb. 4a: 0, 1; Abb. 4b: 0, 4 M; Abb. 4c: 0, 8 M.

B IV 2 b. Abhängigkeit der Inaktivierungsgeschwindigkeit vom pH-Wert

Ein Maß für die Geschwindigkeit, mit der die Sulfatase A in Gegenwart ihres Substrates inaktiviert wird, ist die Halbwertszeit, in der die Geschwindigkeit der durch das Enzym katalysierten, hydrolytischen Reaktion auf die Hälfte ihres Anfangswertes absinkt (Abs. B IV 1). Dies gilt natürlich nur für pH-Bereiche, in denen die Sulfatase A stabil ist (Abs. B III). In der Darstellung der Halbwertszeiten gegen die pH-Werte (Abb. 4a - c) wurde daher der Bereich, in dem das Enzym instabil ist, nicht berücksichtigt.

Die Inaktivierungsgeschwindigkeit ist um so größer, je kleiner die Halbwertszeit ist. Dementsprechend hat die Inaktivierungsreaktion ihr pH-Optimum dort, wo die Kurve der Halbwertszeiten gegen die pH-Werte ein Minimum aufweist. Diese Minima fallen für die verschiedenen Pufferkonzentrationen recht genau mit den jeweils gültigen pH-Optima für die hydrolytische Reaktion zusammen. Die durch die Sulfatase A katalysierte hydrolytische Reaktion und die Reaktion, die zur Inaktivierung des Enzyms führt, haben demnach die gleichen pH-Optima (Abb. 4a - c).

Die Erhöhung der Pufferkonzentration wirkt sich in einer Erhöhung der Halbwertszeiten aus (Abb. 4a - c). Damit verringert sich bei Erhöhung der Pufferkonzentration nicht nur die Anfangsgeschwindigkeit der hydrolytischen Reaktion, sondern auch die Geschwindigkeit der Inaktivierung des Enzyms. Der Wechsel vom Natriumformiat- zum Imidazol-Salzsäure-Puffer ist für die Halbwertszeit ohne erkennbare Bedeutung.

B IV 2 c. pH-Abhängigkeit des maximalen Umsatzes

Im pH-Bereich, in dem die Sulfatase A stabil ist, fällt der maximale Umsatz mit steigenden pH-Werten ab (Abb. 5a - c). Auch bei pH-Werten, die größer als das pH-Optimum sind, ist keine Erhöhung des maximalen Umsatzes zu beobachten, obwohl die Halbwertszeiten der Inaktivierungsreaktion hier wieder leicht ansteigen. Der Wechsel vom Natriumformiat- zum Imidazol-Salzsäure-Puffer wirkt sich in einer leichten Erhöhung des maximalen Umsatzes aus, der sich auch bei steigender Pufferkonzentration erhöht.

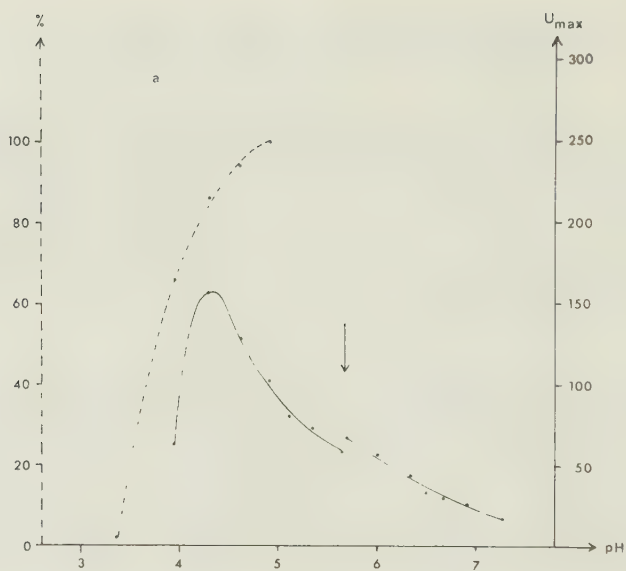


Abb. 5a

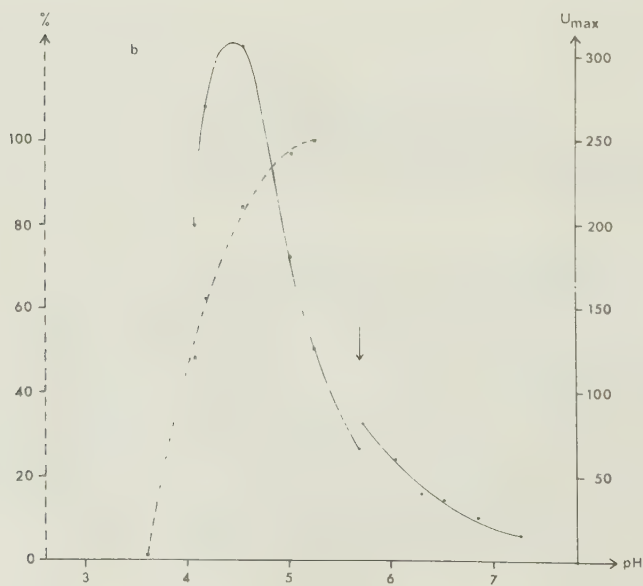


Abb. 5b

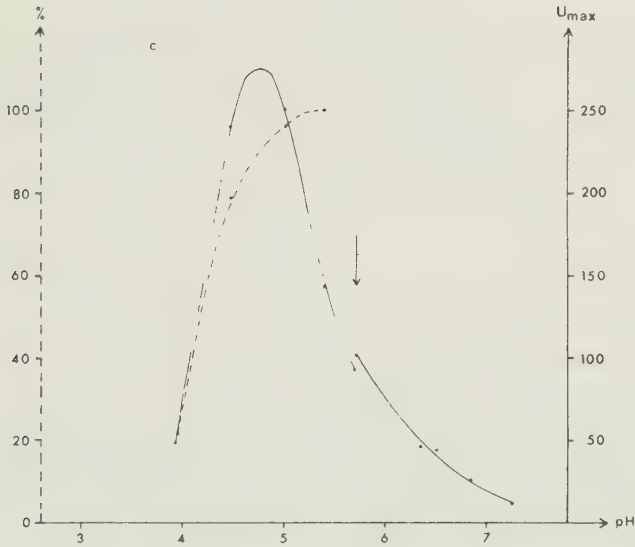


Abb. 5a - c: Maximaler Umsatz der Arylsulfatase-Reaktion und Denaturierungsgeschwindigkeit der Sulfatase A in Abhängigkeit vom pH-Wert. Ordinate: Maximaler Umsatz $U_{\max}$ (nMol NC / μ g Protein) (—) bzw. % Restaktivität des Enzyms nach 30 min Inkubation in Abwesenheit von Substrat (----); Abszisse: pH. Pfeil: Pufferwechsel. Bestimmung von $U_{\max}$ siehe Abs. B IV 1, Bestimmung der Restaktivität siehe Abs. B III. Inkubationsbedingungen und Pufferkonzentrationen wie unter Abb. 4a - c beschrieben.

B IV 2 d. Einfluß der pH-Werte auf die enzymatische Reaktion im pH-Bereich, in dem die Sulfatase A instabil ist

Im pH-Bereich, in dem das Enzym instabil ist, überlagern sich zwei Einflüsse, die beide die Aktivität der Sulfatase A in Abhängigkeit von der Inkubationszeit herabsetzen, und zwar die Inaktivierung durch das Substrat und die pH-bedingte Denaturierung. Die Denaturierung läßt sich durch Vorinkubation des Enzyms im entsprechenden Puffer, jedoch in Abwesenheit von Substrat, allein erfassen (Abs. B III). Sie ist in Abb. 5a - c als Prozentsatz des eingesetzten Enzyms, der nach 30 min Inkubation noch aktiv ist, wiedergegeben.

Die Denaturierung beeinflußt die Linearität der doppelt reziproken Darstellung der Zeit-Umsatz-Kurve bis etwa pH 3,7 nicht. Der maximale Umsatz jedoch, der sich aus dieser Darstellung errechnen läßt, weist im pH-Bereich, in dem das Enzym instabil ist, ein eindeutiges Maximum auf (Abb. 5a - c). Das Maximum liegt bei jeder der drei angewendeten Pufferkonzentrationen etwa 0,5 pH-Einheiten unter dem pH-Wert, bei dem das Enzym noch stabil ist. Demnach scheint die substratbedingte Inaktivierung der Sulfatase A mit abnehmenden pH-Werten immer langsamer zu werden und der maximale Umsatz sollte, allein von der Inaktivierungsreaktion her betrachtet, mit abnehmenden pH-Werten immer weiter steigen. Gleichzeitig aber steigt die Geschwindigkeit der Denaturierungsreaktion, so daß schließlich diese Reaktion für den maximalen Umsatz und die Halbwertszeit der enzymatischen Reaktion bestimmend wird.

Diese Annahme wird durch eine Betrachtung der Halbwertszeiten gestützt. Wird die Aktivität des Enzyms sowohl durch Substratinaktivierung als auch durch pH-Denaturierung reduziert, so muß die Halbwertszeit für die gesamte enzymatische Reaktion kleiner sein als für jede der beiden Teilreaktionen. Die Halbwertszeiten der Denaturierungsreaktionen lassen sich aus Abb. 3 und analogen Darstellungen abschätzen, allerdings nur für solche Reaktionen, bei denen im Meßzeitraum die Aktivität des eingesetzten Enzyms auf die Hälfte absinkt. Die Berechnung der Halbwertszeit der Gesamtreaktion wird für den Fall, daß die doppelt reziproke Darstellung der Zeit-Umsatz-Kurve linear ist, in Abs. B IV 1 beschrieben. In den Fällen, in denen das nicht galt (0,1 M Natriumformiat, pH 3,37, und 0,4 M Natriumformiat, pH 3,62), konnte die Zeit-Umsatz-Kurve, zumindest für den Meßzeitraum, durch die Gleichung

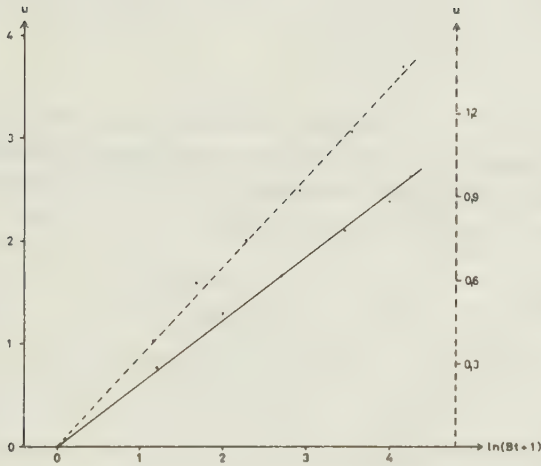


Abb. 6: Logarithmische Darstellung der Zeit-Umsatz-Kurve der Arylsulfatase-Reaktion der Sulfatase A in 0,1 M Natriumformiat, pH 3,37 (-----), bzw. 0,4 M Natriumformiat, pH 3,62 (———). Ordinate: Umsatz u (nMol NC / μ g Protein); Abszisse: $\ln(Bt + 1)$; die Koeffizienten B sind in Abs. B IV 2 d angegeben, t ist die Inkubationszeit (min). Weitere Inkubationsbedingungen: 1,25 μ g/ml Protein; 5 mM NCS.

$$u = A \ln(Bt + 1) \quad (\text{VII})$$

erfaßt werden (Abb. 6). Entsprechend den in Abs. B IV 1 angestellten Überlegungen folgt daraus:

$$\frac{du}{dt} = v = \frac{AB}{Bt + 1} \quad (\text{VII a})$$

$$V_o = A \cdot B \quad (\text{VII b})$$

$$t_{1/2} = \frac{1}{B} \quad (\text{VII c})$$

Die Koeffizienten A und B ergeben sich aus Abb. 6 für 0,1 M Puffer, pH 3,37,

zu A = 3 (nMol NC / μ g Protein) und B = 1,14 (1/min) und für 0,4 M Puffer, pH 3,62, zu A = 11 (nMol NC / μ g Protein) und B = 1,09 (1/min).

Tabelle III

Vergleich der Halbwertszeiten einiger Denaturierungsreaktionen und der enzymatischen Gesamtreaktionen unter den entsprechenden Bedingungen. Bestimmung der Halbwertszeiten siehe Tab. II (Denaturierungsreaktion) und Abs. B IV 1 bzw. Abs. B IV 2 d (enzymatische Gesamtreaktion).

Natriumformiat- konzentration (M)	pH	$t_{1/2}$ (min) Denatur.- reaktion	$t_{1/2}$ (min) enz. Ges.- reaktion
0,8	3,95	4,1	3,0
0,4	4,19	24	12,8
0,4	3,62	1	0,92
0,1	3,37	0,9	0,88

Tab. III zeigt, daß bei pH-Werten, bei denen das Enzym noch relativ stabil ist (z.B. in 0,4 M Puffer, pH 4,19), die Halbwertszeit der enzymatischen Gesamtreaktion deutlich kleiner ist als die der Denaturierungsreaktion. Der Aktivitätsverlust des Enzyms ist hier also auf beide Einflüsse, auf die substratbedingte Inaktivierung und auf die Denaturierung durch niedrige pH-Werte, zurückzuführen. Bei noch niedrigeren pH-Werten verliert die substratbedingte Inaktivierung immer mehr an Einfluß, und in 0,1 M Puffer, pH 3,37, bzw. in 0,4 M Puffer, pH 3,62, ist der Aktivitätsverlust des Enzyms, nach dem Vergleich der Halbwertszeiten zu urteilen, nahezu ausschließlich auf die pH-Denaturierung zurückzuführen.

B IV 2 e. pH-Profil der Reaktion des durch Sulfat reaktivierten Enzyms

Wird das durch Substrateinwirkung inaktivierte Enzym durch Zugabe von Sulfat reaktiviert, so zeigt die nun mit konstanter Geschwindigkeit ablaufende enzymatische Reaktion das in Abb. 7 wiedergegebene pH-Profil. Das Optimum liegt jetzt bei pH 5,7, dem gleichen Wert, den Nicholls und Roy (39) für die entsprechende Reaktion der Sulfatase A aus Rinderleber angeben.

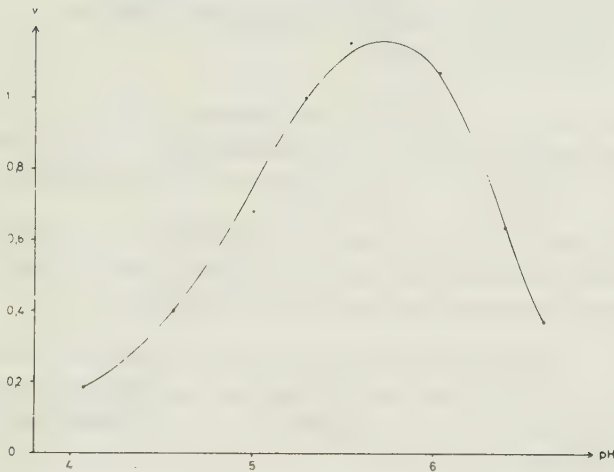


Abb. 7: pH-Profil der Reaktion der durch Natriumsulfat reaktivierten Sulfatase A. Ordinate: Reaktionsgeschwindigkeit ($\text{nMol NC} / \mu\text{g Protein} \cdot \text{min}$); Abszisse: pH. Inkubationsbedingungen: $3,3 \mu\text{g/ml}$ Protein; $0,4 \text{ M}$ Natriumformiat (pH 4,07 - 5,54) bzw. Imidazol-Salzsäure (pH 6,03 - 6,61); 5 mM NCS; 10 mM Natriumsulfat. Weitere Einzelheiten siehe Abs. D V.

Es handelt sich hierbei um das Optimum einer Gesamtreaktion, die sich mindestens aus den drei folgenden Teilreaktionen zusammensetzt:

1. Sulfat reaktiviert das durch sein Substrat inaktivierte Enzym;
2. das reaktivierte Enzym hydrolysiert NCS;
3. Sulfat hemmt die enzymatische Hydrolyse von NCS durch das reaktivierte Enzym (39).

Jede dieser Teilreaktionen dürfte ihr eigenes pH-Profil haben. Es erscheint deshalb zweifelhaft, daß der gefundene Wert mit dem pH-Optimum für die hydrolytische Reaktion der reaktivierten Sulfatase A, also dem Optimum für die Teilreaktion 2, identisch ist. Da es nicht möglich ist, die Teilreaktion 2 getrennt zu untersuchen, kann eine Aussage darüber, ob die reaktivierte und die native Sulfatase A das gleiche pH-Optimum haben, nicht gemacht werden.

B IV 2 f. Wahl des pH-Wertes zur Untersuchung der Wirkung von Substrat-, Puffer- und Enzymkonzentration auf die Arylsulfatase-Aktivität

Für die nachfolgenden Untersuchungen der Wirkung der Substrat-, Puffer- und Enzymkonzentration auf die Reaktion der Sulfatase A wurde statt des pH-Optimums des Enzyms der pH-Wert 5,3 gewählt. Die Gründe dafür waren:

1. Je stärker sich der pH-Wert dem Optimum nähert, um so schneller verläuft die substratbedingte Inaktivierung des Enzyms, was die experimentelle Bestimmung der Reaktionsparameter erheblich erschwert.
2. Auch die Cerebrosidsulfatase-Aktivität des Enzyms mußte bei pH 5,3 untersucht werden, da für diese Reaktion der maximale Umsatz bei höheren pH-Werten so gering wurde, daß er aus experimentellen Gründen nicht mehr bestimmt werden konnte.
3. Alle bisherigen Untersuchungen der Kinetik der Sulfatase A aus Säugern wurden bei pH-Werten um pH 5,3 durchgeführt. Die Möglichkeit zum Vergleich der Resultate mit den Ergebnissen anderer Autoren war ein weiterer Grund für die Wahl des pH-Wertes von 5,3.

B IV 3. Wirkung der Enzym-, Substrat- und Pufferkonzentration auf die Arylsulfatase-Aktivität

B IV 3a. Relation zwischen der Enzymkonzentration und den Parametern der enzymatischen Reaktion

Im Konzentrationsbereich 0,3125 bis 3,125 µg Protein/ml steigen der maximale Umsatz und die Anfangsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion der nativen Sulfatase A proportional zur Enzymkonzentration. Die Halbwertszeit ist dementsprechend für diesen Bereich konstant (Abb. 8). Die komplizierten Beziehungen, die Roy (37) und Baum et al. (38) zwischen Enzymkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit der Sulfatase A gefunden haben, konnten nicht bestätigt werden. Allerdings ist zu berücksichtigen, daß die genannten Autoren die Reaktionsgeschwindigkeit aus dem Substratumsatz nach 15 bis 180 min Inkubation bestimmt haben, und daß ihre Ergebnisse mit Sicherheit durch die unterschiedlichen Mengen an freigesetztem Sulfat, die das inaktivierte Enzym in ent-

sprechend unterschiedlichem Maße reaktivieren (19), beeinflusst worden sind.

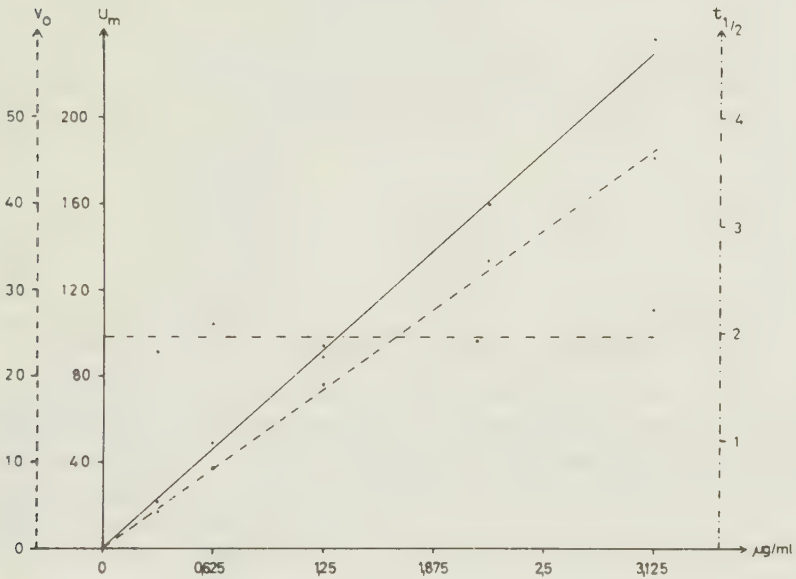


Abb. 8: Maximaler Umsatz $U_{\max}$ (—), Anfangsgeschwindigkeit V_0 (- - -) und Halbwertszeit $t_{1/2}$ (- · - ·) der Arylsulfatase-Reaktion der Sulfatase A in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration. Ordinate: $U_{\max}$ (nMol NC) bzw. V_0 (nMol NC/min) bzw. $t_{1/2}$ (min); Abszisse: Enzymkonzentration (µg/ml). Inkubationsbedingungen: 5 mM NCS; 0,1 M Natriumformiat, pH 5,3). Bestimmung der Reaktionsparameter siehe Abs. B IV 1.

B IV 3 b. Einfluß der Substratkonzentration

Abb. 9 zeigt die doppelt reziproke Zeit-Umsatz-Kurve für die Reaktion der Sulfatase A in 0,1 M Natriumformiat-Puffer, pH 5,3, bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen. Es fällt auf, daß die Geraden in einem Punkt zusammenlaufen. Das bedeutet, daß der maximale Umsatz für alle angewendeten Sub-

stratkonzentrationen gleich ist.

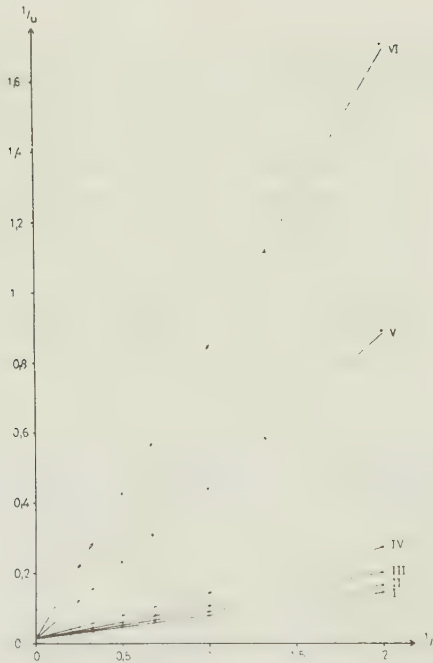


Abb. 9: Doppelt reziproke Darstellung der Zeit-Umsatz-Kurve der Arylsulfatase-Reaktion der Sulfatase A in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Ordinate: Reziprokwert des Umsatzes ($\mu\text{g Protein} / \text{nMol NC}$); Abszisse: Reziprokwert der Inkubationszeit t ($1 / \text{min}$); Inkubationsbedingungen: 1, $25 \mu\text{g/ml}$ Protein; $0,1 \text{ M}$ Natriumformiat, pH 5,3; NCS-Konzentration: I = 5 mM ; II = 2 mM ; III = 1 mM ; IV = $0,5 \text{ mM}$; V = $0,1 \text{ mM}$; VI = $0,05 \text{ mM}$.

Die sich aus Abb. 9 ergebenden Reaktionsparameter sind in Tab. IV zusammengefaßt:

Tabelle IV

Einfluß der Substratkonzentration auf die Parameter der Arylsulfatase-Reaktion der Sulfatase A. Inkubationsbedingungen: 0,1 M Natriumformiat; 1,25 µg/ml Protein; Bestimmung der Reaktionsparameter siehe Abs. B IV 1.

Substrat- konz. (mM)	Halbwerts- zeit (min)	max. Umsatz (nMol NC/µg Protein)	Anfangsgeschw. (nMol NC / µg Protein · min)
5	2,0	74	14,8
2	2,4	74	13,0
1	2,9	74	10,4
0,5	4,1	74	7,5
0,1	13,3	74	2,3
0,05	25,5	74	1,2

Nach Tab. IV sinkt die Halbwertszeit der enzymatischen Reaktion mit steigender Substratkonzentration. Mithin wird die substratbedingte Inaktivierung um so schneller, je höher die Substratkonzentration ist. Das gleiche gilt, wie nach der Michaelis-Menten Theorie nicht anders zu erwarten, für die Anfangsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion.

B IV 3c. Scheinbare Michaeliskonstante für die enzymatische Reaktion in 0,1 M Natriumformiat-Puffer

Aus den in Tab. IV wiedergegebenen Anfangsgeschwindigkeiten lassen sich die scheinbare Michaeliskonstante $K_{0,5}$ und die maximale Geschwindigkeit $V_{\max}$ der enzymatischen Reaktion in 0,1 M Natriumformiat-Puffer bestimmen. Die entsprechende Darstellung der Michaeliskurve nach Lineweaver-Burk ist in Abb. 10 aufgezeigt. Aus Abb. 10 ergeben sich die Werte $K_{0,5} = 0,66 \text{ mM}$ und $V_{\max} = 17,3 \text{ nMol NC pro } \mu\text{g Protein und min.}$

Aus der Tatsache, daß für alle angewendeten Substratkonzentrationen der gleiche maximale Umsatz gilt, geht hervor, daß die scheinbare Michaeliskonstante für das nicht reaktivierte Enzym bei steigender Inkubationszeit asymptotisch gegen 0 geht, wenn die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion nicht anhand der Zeit- Umsatz-Kurve, sondern durch Endpunktsbestimmungen ermittelt wird.

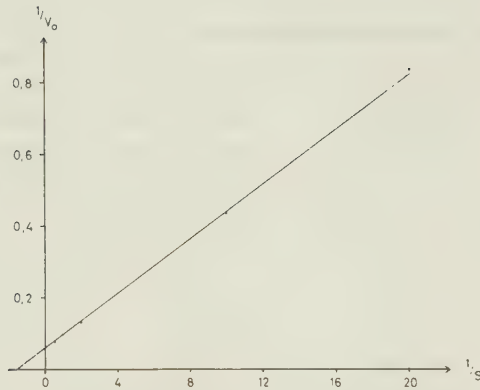


Abb. 10: Lineweaver-Burk Darstellung der Michaeliskurve für die Arylsulfatase-Reaktion der Sulfatase A in 0,1 M Natriumformiat, pH 5,3. Ordinate: Reziprokwert der Anfangsgeschwindigkeit V_0 ($\text{nMol NC}^{-1} \cdot \mu\text{g Protein} \cdot \text{min}$); Abszisse: Reziprokwert der Substratkonzentration s (mM^{-1}). Die Werte für V_0 wurden Tab. IV entnommen.

B IV 3 d. Einfluß der Pufferkonzentration auf die scheinbare Michaeliskonstante

Endpunktsbestimmungen wurden aus arbeitstechnischen Gründen durchgeführt, um den Einfluß der Pufferkonzentration auf die scheinbare Michaeliskonstante zu untersuchen. Als Inkubationszeiten wurden 1, 5 und 10 min gewählt. Abb. 11a und b zeigen typische Beispiele für die Michaelis- und Lineweaver-Burk-Kurven, die sich bei 1 min Inkubation und verschiedenen Pufferkonzentrationen ergeben. Aus Abb. 11a ist ersichtlich, daß die Reaktionsgeschwindigkeit bei niedriger Substratkonzentration mit steigender Pufferstärke sinkt, während der $K_{0,5}$ -Wert gleichzeitig ansteigt. Demnach hemmt Natriumformiat die enzymatische Aktivität der Sulfatase A.

Die Abhängigkeit der $K_{0,5}$ -Werte bei 1, 5 und 10 min Inkubation von der Pufferkonzentration zeigt Abb. 12. Die Tatsache, daß die $K_{0,5}$ -Werte proportional zur Natriumformiatkonzentration ansteigen, erlaubt die Berechnung (51) der

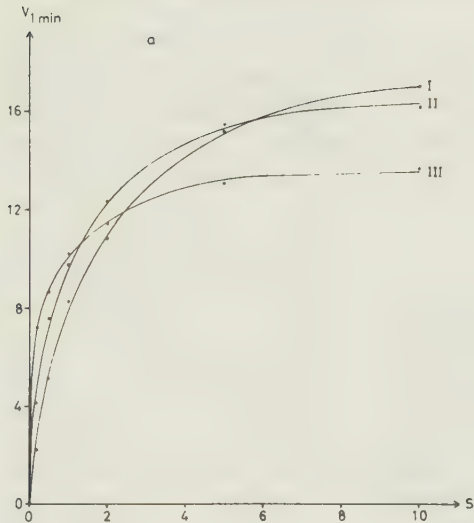


Abb. 11 a: Michaeliskurven für die Arylsulfatase-Reaktion der Sulfatase A bei 1 min Inkubationszeit. Ordinate: Reaktionsgeschwindigkeit $V_{1 \text{ min}}$ (nMol NC / μg Protein $\cdot$ min); Abszisse: NCS-Konzentration S (mM). Inkubationsbedingungen: 3, 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Protein; Natriumformiat-Konzentrationen: I = 0,8 M; II = 0,2 M; III = 0,05 M; pH 5,3.

scheinbaren Michaeliskonstanten in Abwesenheit des Inhibitors K_m und der Inhibitorkonstanten K_i nach der Gleichung:

$$K_{0,5} = K_m \left(1 + \frac{c_{\text{Inhibitor}}}{K_i} \right) \quad (\text{VIII})$$

Die K_m - und K_i -Werte, die sich aus dieser Berechnung ergeben, sind in Tab. V aufgeführt.

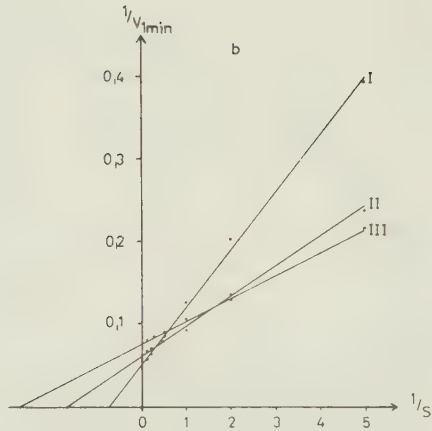


Abb. 11b: Lineweaver-Burk Darstellung entsprechend Abb. 11 a.

Tabelle V

Scheinbare Michaelis- und Inhibitor-Konstanten der Sulfatase A bei verschiedenen Inkubationszeiten. Substrat: NCS; Inhibitor: Natriumformiat; Die K_m und K_i -Werte wurden Abb. 12 entnommen.

Inkubationszeit (min)	K_m (mM)	K_i (mM)
1	0,3	238
5	0,24	221
10	0,09	124

Das Absinken der scheinbaren Michaeliskonstanten $K_{0,5}$ und K_m mit steigender Inkubationszeit ist nach Abs. B IV 3 b darauf zurückzuführen, daß der

maximale Umsatz für alle Substratkonzentrationen gleich ist.

In Anbetracht der Komplexität der Faktoren, die die Michaeliskurve beeinflussen, kann keine eindeutige Aussage über den Mechanismus der Hemmung der Sulfatase A durch Natriumformiat gemacht werden. Allerdings deutet die Proportionalität zwischen $K_{0,5}$ -Werten und Pufferkonzentration nach Dixon und Webb (51) auf eine kompetitive Hemmung hin.

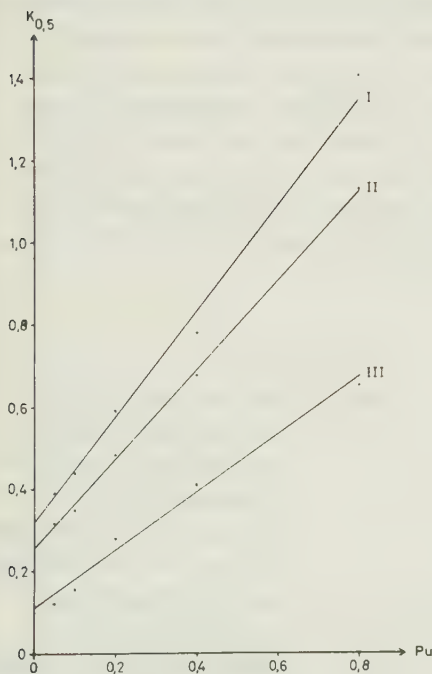


Abb. 12: Abhängigkeit der scheinbaren Michaeliskonstanten $K_{0,5}$ der Arylsulfatase-Reaktion der Sulfatase A von der Natriumformiat-Konzentration und der Inkubationszeit. Ordinate: $K_{0,5}$ (mM); Abszisse: Pufferkonzentration (M). Inkubationsbedingungen wie unter Abb. 11 angegeben. Inkubationszeit: I = 1 min; II = 5 min; III = 10 min.

Die Hemmwirkung des Puffers auf die enzymatische Reaktion und die Abhängigkeit der scheinbaren Michaeliskonstanten von der angewendeten Inkubationszeit gehen jedoch eindeutig aus den Ergebnissen hervor. Wahrscheinlich ist es auf diese beiden Faktoren zurückzuführen, daß in der Literatur so unterschiedliche Werte wie 1,54 mM (49) und 0,53 mM (47) als scheinbare Michaeliskon-

stante der menschlichen Sulfatase A angegeben werden.

B IV 3 e. Inhibitorische Wirkung von Natriumsulfat auf das native Enzym

Die kompetitive Hemmung der Sulfatase A aus Rinderleber durch Sulfat-Ionen ist bekannt (52). Entsprechende Daten für die menschliche Sulfatase A lagen nicht vor.

Abb. 13 zeigt, daß auch die menschliche Sulfatase A kompetitiv durch Sulfat-Ionen gehemmt wird. Die scheinbare Michaeliskonstante und die Hemmkonstante, die sich aus Abb. 13 ergeben, sind $K_{0,5} = 0,67 \text{ mM}$ und $K_i = 8,7 \text{ mM}$. Da die Untersuchung in $0,4 \text{ M}$ Natriumformiat als Puffer durchgeführt wurde, und da nicht die Anfangsgeschwindigkeiten sondern die Umsätze nach 1 min Inkubation gemessen wurden, sind in diesen Werten noch der hemmende Einfluß des Puffers und der die Werte erniedrigende Einfluß der Inkubationszeit enthalten. Trotzdem ist zu erkennen, daß die Affinität des Enzyms zu Natriumsulfat erheblich höher ist als zu Natriumformiat.

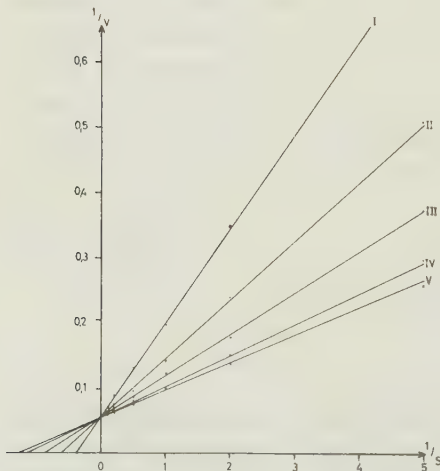


Abb. 13: Lineweaver-Burk Darstellung der Michaeliskurven der Arylsulfatase-Reaktion der Sulfatase A in Gegenwart von Natriumsulfat. Ordinate: Reziprokwert der Reaktionsgeschwindigkeit $V_{1 \text{ min}}$ ($\text{nMol NC}^{-1} \cdot \mu\text{g Protein} \cdot \text{min}$); Abszisse: Reziprokwert der NCS-Konzentration s (mM^{-1}). Inkubationsbedingungen: $0,4 \text{ M}$ Natriumformiat, $\text{pH } 5,3$;

$3,125 \mu\text{g/ml}$ Protein; Natriumsulfat-Konzentration: I = 25 mM ; II = $12,5 \text{ mM}$; III = $6,25 \text{ mM}$; IV = $2,5 \text{ mM}$; V = $1,25 \text{ mM}$.

B IV 3 f. Einfluß der Natriumformiatkonzentration auf die
Parameter der enzymatischen Reaktion

In Abb. 14 sind die Reaktionsparameter Anfangsgeschwindigkeit, maximaler Umsatz und Halbwertszeit der Sulfatase A in Relation zur Pufferstärke dargestellt. Es zeigt sich, daß die Halbwertszeit und der maximale Umsatz mit der Pufferkonzentration ansteigen. Die Geschwindigkeit der Inaktivierungsreaktion wird also um so geringer, je höher die Natriumformiat-Konzentration ist. Die Anfangsgeschwindigkeit der hydrolytischen Reaktion zeigt einen komplexeren Verlauf: Zunächst steigt sie mit steigender Pufferstärke steil an, um nach

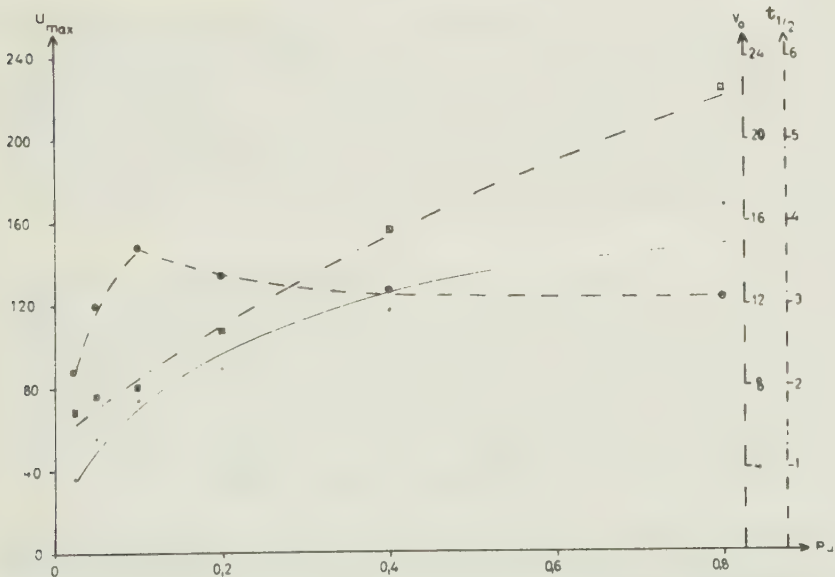


Abb. 14: Maximaler Umsatz $U_{\max}$ (—), Anfangsgeschwindigkeit V_0 (---) und Halbwertszeit $t_{1/2}$ (- · - · -) der Arylsulfatase-Reaktion der Sulfatase A in Abhängigkeit von der Natriumformiat-Konzentration. Ordinate: $U_{\max}$ (nMol NC / μ g Protein) bzw. V_0 (nMol NC / μ g Protein · min) bzw. $t_{1/2}$ (min); Abszisse: Pufferkonzentration (M). Inkubationsbedingungen: 1,25 μ g /ml Protein; 5 mM NCS. Bestimmung der Reaktionsparameter siehe Abs. B IV 1.

einem Maximum bei etwa 0,1 M Formiatkonzentration langsam wieder abzufallen.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen überein, die sich aus der Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Arylsulfatase-Aktivität des Enzyms bei verschiedenen Pufferstärken ergeben haben (Abs. B IV 2 a - c; Abb. 4a - 4c und 5a - 5c).

B IV 3 g. Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion nach Reaktivierung der inaktivierten Sulfatase A durch Sulfat-Ionen in Abhängigkeit von der Pufferkonzentration

Nach einer Inkubationsdauer von 30 min ist die Sulfatase weitgehend inaktiviert. Durch Zugabe von in Wasser gelöstem Natriumsulfat zu einer Konzentration von 10 mM wird das Enzym langsam wieder reaktiviert, und die enzymatische Reaktion geht dann zu konstanten Geschwindigkeiten über. Diese konstanten Geschwindigkeiten sind ebenfalls von der Natriumformiat-Konzentration im Inkubationsansatz abhängig, und zwar steigen sie mit wachsender Pufferstärke an (Abb. 15).

Da das Enzym von vornherein in unterschiedlichen Pufferkonzentrationen inkubiert wurde, und da diese Konzentrationen den Verlauf der enzymatischen Reaktion beeinflussen (Abs. B IV 3 e), sind bis zur Zugabe des Natriumsulfates durch Hydrolyse des Substrates unterschiedliche Mengen an Sulfat-Ionen freigesetzt worden, und zwar zwischen 0,1 mM/L in 0,025 M und 0,3 mM/L in 0,8 M Pufferlösung. Diese geringen Mengen an Sulfat-Ionen konnten jedoch vernachlässigt werden, wie der folgende Versuch zeigte:

Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde ein Inkubationsansatz in 0,4 M Natriumformiat in zwei gleiche Teilansätze geteilt. Zu beiden Teilansätzen wurde gleichzeitig soviel Natriumsulfat-Lösung zugeführt, daß die Sulfat-Ionen-Konzentration im ersten Ansatz 9,75 mM/l und im zweiten 10,25 mM/l betrug. Die resultierende konstante Reaktionsgeschwindigkeit war im ersten Ansatz 1,57 nMol NC / μ g Protein $\cdot$ min und im zweiten 1,56 nMol NC / μ g Protein $\cdot$ min.

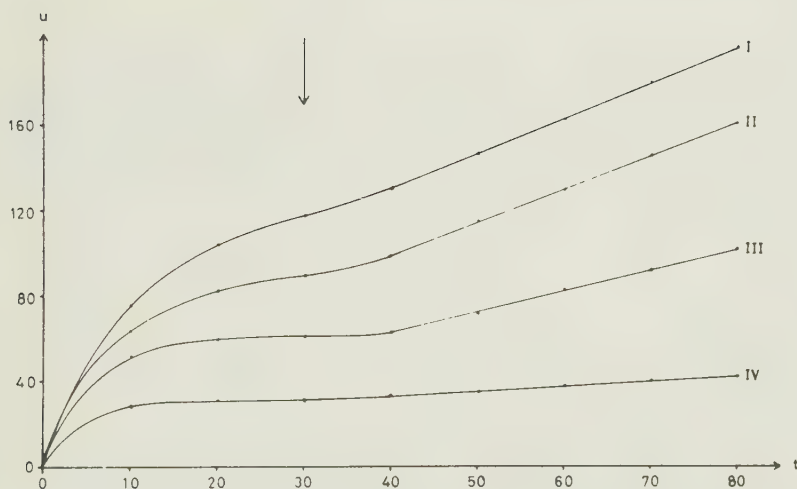


Abb. 15: Einfluß der Natriumformiat-Konzentration auf die konstante Reaktionsgeschwindigkeit, die sich nach Reaktivierung der substratinaktivierten Sulfatase A durch Sulfat einstellt. Ordinate: Umsatz u (nMol NC / μ g Protein); Abszisse: Inkubationszeit t (min). Inkubationsbedingungen: 1,25 μ g/ml Protein; 5 mM NCS; Natriumsulfat-Zugabe nach 30 min (Pfeil); Natriumsulfat-Konzentration: 10 mM; Pufferkonzentration Pu (M) und konstante Reaktionsgeschwindigkeit v_k (nMol NC / μ g Protein $\cdot$ min): I = Pu : 0,8; v_k : 1,63. II = Pu : 0,4; v_k : 1,57. III = Pu : 0,1; v_k : 1,02. IV = Pu : 0,025; v_k : 0,22.

B IV 3 h. Vergleich der Einflüsse von Natriumformiat, -acetat, propionat und -chlorid.

Der Einfluß von Natriumacetat und -propionat auf die Sulfatase A ist dem von Natriumformiat sehr ähnlich: Die enzymatische Reaktion wird durch die genannten Elektrolyte gehemmt und gleichzeitig üben sie einen konzentrationsabhängigen Einfluß auf die Geschwindigkeit aus, mit der das Enzym durch sein Substrat inaktiviert wird. Ein Vergleich zeigt, daß die Hemmkonstante mit wachsender Kettenlänge des Anions ansteigt, während gleichzeitig die Halbwertszeit der enzymatischen Reaktion sinkt (Tab. VI).

Tabelle VI

Hemmkonstanten und Halbwertszeiten der enzymatischen Reaktion in Gegenwart von Natriumformiat, -acetat und -propionat. Inkubationszeit zur Bestimmung der Hemmkonstanten: 5 min. Inkubationsbedingungen zur Bestimmung der Halbwertszeiten: 1,25 µg/ml Protein; 0,4 M Pufferkonzentration; 5 mM Substratkonzentration.

Elektrolyt	K_i (mM)	$t_{1/2}$ (min)
Natriumformiat	221	3,9
Natriumacetat	256	3,4
Natriumpropionat	362	2,3

Der Effekt von Natriumchlorid auf die Kinetik der Arylsulfatase-Reaktion wurde in Gegenwart von Natriumformiat als Puffer untersucht. Die Zeit-Umsatz-Kurven in Gegenwart von 0,025 M Natriumformiat und 0,08 bzw. 0,8 M Natriumchlorid (Abb. 16) zeigen, daß Natriumchlorid die Reaktion der Sulfatase A qualitativ in der gleichen Weise beeinflußt wie Natriumformiat.

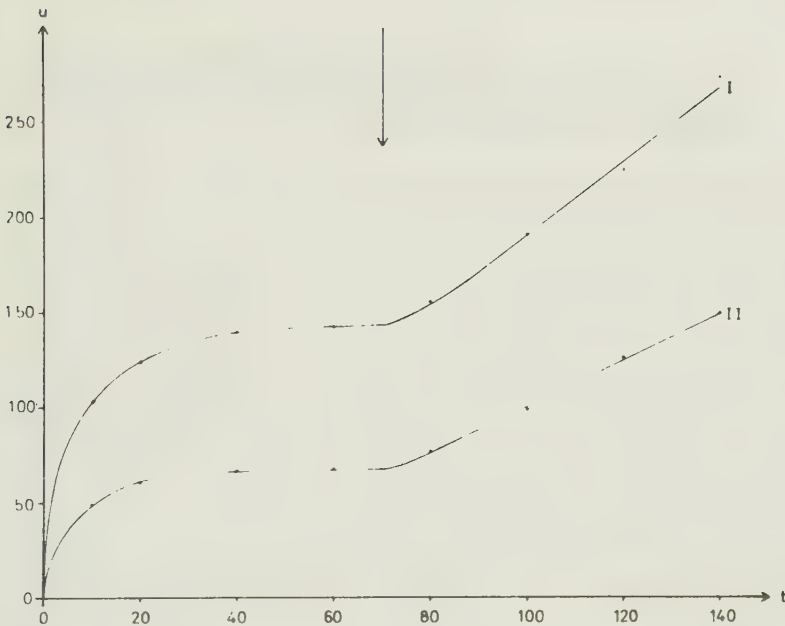


Abb. 16: Zeit-Umsatz-Kurve in Gegenwart von NaCl. Ordinate: Umsatz u (nMol NC / μg Protein); Abszisse: Inkubationszeit t (min). Inkubationsbedingungen: 1, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Protein; 5 mM NCS; 0,025 M Natriumformiat, pH 5,3; NaCl-Konzentration: I: 0,8 M; II: 0,08 M. Nach einer Inkubationszeit von 70 min wurden 222 μl 0,1 M Na_2SO_4 zu 2 ml Inkubationslösung zugegeben (Pfeil).

B V. Einfluß von Cerebrosidsulfat auf die Arylsulfatase-Aktivität

Die Untersuchung der Cerebrosidsulfatase-Reaktion der Sulfatase A wurde durch die geringe Löslichkeit der Cerebrosidsulfate (Abs. C) und besonders durch den methodisch bedingten, hohen Fehler bei der Bestimmung der Cerebrosidsulfatase-Aktivität (Abs. B VI 2) erheblich erschwert. Es wurde deshalb

zunächst versucht, durch Untersuchung des Einflusses von Cerebrosidsulfat auf die Arylsulfatase-Aktivität Aufschluß über den Zusammenhang zwischen Aryl- und Cerebrosidsulfatase-Aktivität des Enzyms zu bekommen.

B V 1. Abhängigkeit der Arylsulfatase-Aktivität in Gegenwart und Abwesenheit von Cerebrosidsulfat sowie der Cerebrosidsulfatase-Aktivität von der Pufferkonzentration

Abb. 17 zeigt die Abhängigkeit der Arylsulfatase-Aktivität von der Pufferkonzentration und von der Gegenwart von Cerebrosidsulfaten. Die enzymatische Aktivität wurde aus dem Umsatz an Substrat nach 5 min Inkubation bestimmt, die Substratkonzentration betrug 0,5 mM. Der Verlauf der Kurve, die die Abhängigkeit allein der Arylsulfatase-Aktivität von der Pufferkonzentration wiedergibt, läßt sich unter Berücksichtigung der Bedingungen zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität aus den in Abs. B IV 3 aufgeführten Ergebnissen erklären. In Gegenwart von 0,1 mM Cerebrosidsulfat ändert sich das Bild völlig: Bei sehr niedrigen Pufferstärken wird die Arylsulfatase-Aktivität der Sulfatase A stark gehemmt. Die Hemmung wird umso schwächer, je höher die Puffer-Konzentration ist und schlägt schließlich ab 0,07 M Natriumformiat-Konzentration in eine Aktivierung um. Betrachtet man nun die Cerebrosidsulfatase-Aktivität, wie sie aus der Bestimmung des Substrat-Umsatzes nach 10 min Inkubation bei 0,074 mM Cerebrosidsulfat-Konzentration resultiert, so ergibt sich, daß diese Aktivität des Enzyms sich nur bei stark verdünnten Puffern entfalten kann. Demnach wird die Arylsulfatase-Aktivität des Enzyms gerade in dem Konzentrationsbereich des Puffers gehemmt, in dem das Enzym Cerebrosidsulfatase-Aktivität zeigt.

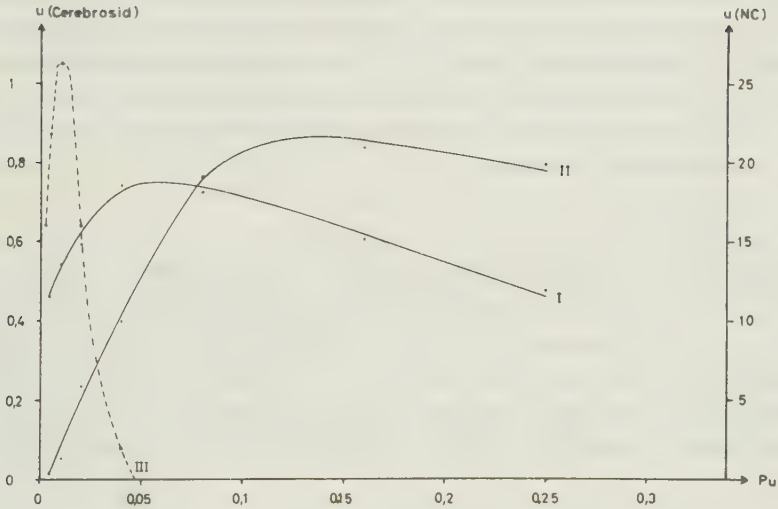


Abb. 17: Arylsulfatase-, Cerebrosidsulfatase- und Einfluß von Cerebrosidsulfat auf die Arylsulfatase-Reaktion in Abhängigkeit von der Natriumformiat-Konzentration. Ordinate: Umsatz u (nMol NC / μ g Protein $\cdot$ 5 min) Abszisse: Natriumformiat-Konzentration (P_u) (M). Puffer: Natriumformiat, pH 5,3; Proteinkonzentrationen: 3, 125 μ g/ml bei der Arylsulfatase-, 32,5 μ g/ml bei der Cerebrosidsulfatase-Reaktion; Substratkonzentrationen: 0,5 mM NCS bzw. 0,1 mM Cerebrosidsulfat; Inkubationszeit: 5 min.

- I: Arylsulfatase-Aktivität in Abwesenheit von Cerebrosidsulfat;
- II: Arylsulfatase-Aktivität in Gegenwart von 0,1 mM Cerebrosidsulfat;
- III: Cerebrosidsulfatase-Aktivität.

B V 2. Einfluß von Cerebrosidsulfat auf die Zeit-Umsatz-Kurve der Arylsulfatase-Reaktion

Der Einfluß von Cerebrosidsulfat auf die Zeit-Umsatz-Kurve der Arylsulfatase-Reaktion der Sulfatase A wurde unter verschiedenen Bedingungen geprüft. Variiert wurden die Natriumformiatkonzentration (0,01 bzw. 0,1 M), die Nitrocatecholsulfat-Konzentration (0,5 bzw. 5 mM), die Cerebrosidsulfatkonzentration (0 bzw. 0,1 mM) und die Zeit, die das Enzym mit Cerebrosidsulfat in Abwesenheit von Nitrocatecholsulfat vorinkubiert wurde (0 bzw. 30 min.). Die Ergebnisse sind in Tabelle VII zusammengefaßt.

Tabelle VII

Einfluß von Cerebrosidsulfat auf die Parameter der Arylsulfatase Reaktion der Sulfatase A. Inkubationsbedingungen: Nitrocatecholsulfat (NCS)-, Cerebrosidsulfat (CS)- und Natriumformiat (Pu)-Konzentrationen wie angegeben; 1,25 µg/ml Protein; pH 5,3. Die Werte des maximalen Umsatzes $U_{\max}$, der Anfangsgeschwindigkeit V_0 und der Halbwertszeit $t_{1/2}$ der enzymatischen Reaktion wurden aus den doppelt reziproken Zeit-Umsatz-Kurven der Arylsulfatase-Reaktion berechnet.

Konz. (M)	NCS-Konz. (mM)	CS-Konz. (mM)	Ink.-Zeit ohne NCS (min)	$U_{\max}$ (nMol NC/µg Protein)	V_0 (nMol NC/µg Protein · min)	$t_{1/2}$ (min)
0,01	0,5	0	0	27,7	3,9	2,9
0,01	0,5	0,1	0	26,4	2,0	5,5
0,01	0,5	0,1	30	13,5	1,1	5,1
0,01	5	0	0	28	6,4	1,8
0,01	5	0,1	0	27,8	3,4	3,4
0,01	5	0,1	30	12,4	2,0	2,6
0,1	0,5	0	0	74	7,5	4,1
0,1	0,5	0,1	0	76	9,1	3,5
0,1	0,5	0,1	30	72	9,2	3,3

Bei niedriger Pufferkonzentration (0,01 M) bleibt der maximale Umsatz an Nitrocatecholsulfat von der Gegenwart des Cerebrosidsulfates nahezu unbeeinflusst, solange das Enzym nicht mit Cerebrosidsulfat vorinkubiert wird. Die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion dagegen wird deutlich erniedrigt, und zwar auf 52,8% bei 0,5 mM und auf 53% bei 5 mM Nitrocatecholsulfat-Konzentration. Wird das Enzym darüberhinaus 30 min mit Cerebrosidsulfat vorinkubiert, bevor die Arylsulfatase-Reaktion durch Zugabe von Nitrocatecholsulfat gestartet wird, so werden sowohl der maximale Umsatz als auch die Anfangsgeschwindigkeit deutlich erniedrigt, und zwar bei 0,5 mM Nitrocatecholsulfat-Konzentration der maximale Umsatz um 56% und Anfangsgeschwindigkeit um 54%, bei 5 mM Nitrocatecholsulfat-Konzentration der maximale Umsatz um 45% und die Anfangsgeschwindigkeit um 58%, verglichen mit der entsprechenden Reaktion ohne Vorinkubation. Daraus muß geschlossen werden, daß die Sulfatase A auch bei der Reaktion mit ihrem natürlichen Substrat, dem Cerebrosidsulfat, inaktiviert wird. Die Tatsache, daß der maximale Umsatz nicht signifikant durch die Gegenwart von Cerebrosidsulfat verändert wird, wenn die beiden Reaktionen gleichzeitig gestartet werden, deutet auf zweierlei:

1. Der Beitrag der Cerebrosidsulfatase-Reaktion zur Inaktivierung der Sulfatase A in Gegenwart von Nitrocatecholsulfat ist gering, obwohl ihre enzymatische Aktivität gegenüber Nitrocatecholsulfat durch Cerebrosidsulfate stark gehemmt wird.
2. Nach Jerfy und Roy (33) wird die Sulfatase A bei der Cerebrosidsulfatase-Reaktion in Gegenwart von 2 mM Taurodesoxycholat, und wenn der Inkubationsansatz heftig gerührt wird, langsam denaturiert. Eine solche Denaturierung findet unter den vorliegenden Inkubationsbedingungen nicht statt. Der anomale Verlauf der Zeit-Umsatz-Kurve der Cerebrosidsulfatase-Reaktion (Abs. B VI 3) muß daher auf die gleichen Ursachen zurückgeführt werden, wie die analoge Erscheinung bei der Arylsulfatase-Reaktion.

Bei 0,1 M Natriumformiat-Konzentration liegen andere Verhältnisse vor. Wie schon nach Abb. 17 zu erwarten, wird die Arylsulfatase-Reaktion bei dieser Pufferstärke nicht mehr durch Cerebrosidsulfat gehemmt, im Gegenteil, die Anfangsgeschwindigkeit wird um etwa 2% erhöht, und zwar unabhängig davon, ob das Enzym mit Cerebrosidsulfat vorinkubiert wurde oder nicht. Der maximale Umsatz ist nun unter allen drei Bedingungen nahezu gleich. Auch dieses Ergebnis zeigt, daß die Sulfatase A durch Cerebrosidsulfat nicht denaturiert

werden kann.

B V 3. Hemmung der Arylsulfatase-Aktivität durch Cerebrosidsulfat

Die Hemmung der Arylsulfatase - Aktivität des Enzyms durch Cerebrosidsulfat wurde in 0,01 M Natriumformiat-Puffer untersucht, bei einer Pufferkonzentration also, bei der das Enzym Cerebrosidsulfat hydrolysiert. Um die Elektrolytkonzentration im Inkubationsansatz durch den Substratzusatz nicht zu stark zu ändern, wurden Nitrocatecholsulfat-Konzentrationen von 1 mM und kleiner gewählt.

Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt Abb. 18. Cerebrosidsulfat hemmt die

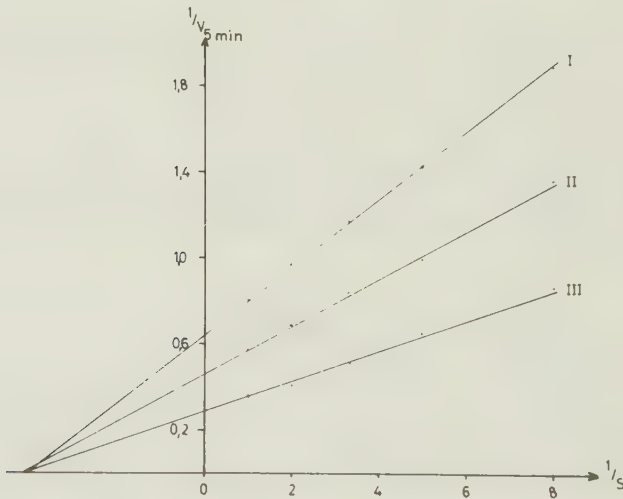


Abb. 18: Michaelis-Kurven der Arylsulfatase-Reaktion in Gegenwart und Abwesenheit von Cerebrosidsulfat, Darstellung nach Lineweaver und Burk. Ordinate: Reziprokwert der mittleren Geschwindigkeit nach 5 min Inkubation $1/v_{5\text{min}}$ ($\text{nMol NC}^{-1} \cdot \mu\text{g Protein} \cdot \text{min}$); Abszisse: Reziprokwert der Substratkonzentration $1/s$ (mM NCS^{-1}). Inkubationsbedingungen: 0,01 M Natriumformiat, pH 5,3; $3,125 \mu\text{g/ml}$ Protein; Inkubationszeit: 5 min; Cerebrosidsulfat-Konzentration: I: 0,1 mM; II: 0,05 mM; III: 0 mM.

Arylsulfatase-Aktivität des Enzyms nicht-kompetitiv. Die scheinbare Michaeliskonstante der Reaktion unter den aufgeführten Bedingungen ist 0,24 mM, die Hemmkonstante für Cerebrosidsulfat 0,08 mM.

B VI. Die Cerebrosidsulfatase-Aktivität

B VI 1. Substrat zur Bestimmung der Cerebrosidsulfatase-Aktivität

Cerebrosidsulfat des Nicht-Hydroxyfettsäure-Typs, das aus Rinderhirnen extrahiert (53) und durch mehrfache Chromatographie an Magnesiumsilikaten gereinigt worden war (54), diente als Substrat zur Bestimmung der Cerebrosidsulfatase-Aktivität der Sulfatase A.

Zur Trennung von Substrat und Reaktionsprodukten nach der enzymatischen Reaktion diente die Dünnschichtchromatographie, mit der sich Cerebrosidsulfat und Cerebrosid sauber voneinander trennen lassen (23). Um diese Nachweismethode empfindlicher zu gestalten, wurde Cerebrosidsulfat radioaktiv markiert. Zur Markierung boten sich drei Verfahren an: Die Methode der Tritierung nach Wilzbach, die biosynthetische Methode durch Verfütterung radioaktiv markierter Vorstufen der Cerebrosidsulfate wie ^{35}S -Sulfat oder ^{14}C -Galaktose an junge Versuchstiere (26) und die katalytische Addition von Tritium an Doppelbindungen im Cerebrosidsulfat-Molekül. Die Wilzbach-Methode schied von vornherein aus, da die Cerebrosidsulfate unter den Bedingungen der Tritierung nach Wilzbach in eine Unzahl nicht definierter Verbindungen zersetzt werden, aus denen sich das reine Substrat nur schwer, wenn überhaupt, isolieren läßt (55). Die biosynthetische Methode wurde nicht angewendet, da dabei nur eine geringe Markierung zu erwarten ist (56). Geeigneter als diese beiden Verfahren erwies sich die Hydrierung der Doppelbindungen im Cerebrosidsulfat-Molekül mit einem Platinoxidkatalysator durch Tritiumgas. Die Schwierigkeit lag dabei in der geringen Löslichkeit des Lipids in Lösungsmitteln, die bei katalytischen Hydrierungen angewendet werden können. In einem Gemisch aus Benzol und Dimethylformamid (3 : 1) wurde schließlich ein Lösungsmittelsystem gefunden, in dem sich Cerebrosidsulfate sehr leicht lösen, und das zudem protonenfrei ist. Allerdings hemmt Dimethylformamid die katalytische Reaktion (57). Trotzdem wurde durch die Tritierung ein Produkt gewonnen, das nach Entfernung labil gebundenen Tritiums und Nachreinigung an Magnesiumsilikatsäulen eine spezifische Aktivität von 540 mCi pro mMol aufwies.

Die Reinheit des Cerebrosidsulfates wurde an Dünnschichtchromatogrammen

nach Anfärben mit dem Sprühreagenz nach Kaegi-Miescher (58) und durch Auswertung mit Hilfe eines Radiodünnschichtscanners überprüft. Die Anfärbung zeigte keine erkennbaren Verunreinigungen, die Auswertung mit dem Radiodünnschichtscanner ergab, daß die Menge der radioaktiven Verunreinigungen unter 0,1% lag.

Spaltung des Cerebrosidsulfates in methanolischer Schwefelsäure und Trennung der Methanolyseprodukte (59) zeigte, daß die Markierung zu etwa 94% im Fettsäure-, zu etwa 5% im Sphingenin- und zu etwa 1% im Galaktose-Anteil des Moleküls enthalten war. Da Cerebrosidsulfat aus menschlichem Hirn auch im natürlichen Zustand zu 5 bis 10% Sphinganin (60) und zu etwa 80% gesättigte Fettsäuren enthält, ist nicht zu erwarten, daß die Substrateigenschaften des Cerebrosidsulfates durch die Addition von Tritium an die Doppelbindungen wesentlich verändert werden.

B VI 2. Bestimmung der Cerebrosidsulfatase-Aktivität

Zur Bestimmung der Cerebrosidsulfatase-Aktivität der Sulfatase A wurde Cerebrosidsulfat im Inkubationsansatz ohne Enzym durch Ultraschall-Behandlung dispergiert (61), bei 37° vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe des ebenfalls vorinkubierten Enzyms gestartet. Zum Abbruch der Reaktion wurde der Inkubationsansatz mit 1 N NaOH auf pH 10-12 gebracht und anschließend auf eine Kieselgel-Dünnschichtplatte aufgetragen. Das Chromatogramm wurde entwickelt und mit Hilfe eines Radiodünnschichtscanners ausgewertet. Dabei traten drei Peaks auf (Abb. 19), die dem am Start zurückgehaltenen Cerebrosid und Cerebrosidsulfat (Startpeak), dem Cerebrosidsulfatfleck (CS-Peak) und dem Cerebrosidfleck (C-Peak) entsprachen. Der Startpeak machte in der Regel weniger als 1% der Gesamtfläche der Peaks aus, er wurde bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Die Peakflächen sind der Anzahl der Impulse pro Zeiteinheit und damit der Substanzmenge in dem zum Peak gehörigen Substanzfleck proportional (62). Damit läßt sich aus der Summe der Flächen des Cerebrosidsulfat- und Cerebrosid-Peaks und der Fläche des Cerebrosid-Peaks allein der Prozentsatz des Substrates, das abgebaut worden ist, berechnen und daraus, da die Menge des eingesetzten Substrates bekannt ist, die Absolutmenge an Produkt, die während der Inkubationszeit gebildet worden ist.

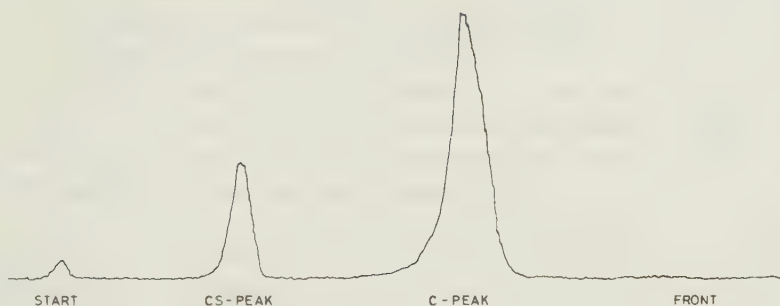


Abb.19: Beispiel einer radiodünnschichtchromatographischen Auswertung einer Cerebrosidsulfatase-Inkubation. Die Chromatographie wurde an einer vorgefertigten Kieselgel-Dünnschichtplatte, Schichtdicke: 0,25 mm, durchgeführt. Das Laufmittel war Chloroform/Methanol/Wasser (14 : 6 : 1). Zur Auswertung wurde der Dünnschicht-Scanner II der Firma Berthold verwendet. Start: Stelle auf der Dünnschichtplatte, auf der der Inkubationsansatz aufgetragen wurde; Front: Lösungsmittelfront nach 150 min Laufzeit; CS-Peak: Cerebrosidsulfat-Peak; C-Peak: Cerebrosid-Peak.

Man hat damit ein einfaches Verfahren zur Bestimmung der Cerebrosidsulfatase-Aktivität der Sulfatase A in der Hand, das allerdings einige Nachteile aufweist:

Die Genauigkeit einer quantitativen Bestimmung mit Hilfe der Radiodünnschichtchromatographie hängt von mehreren Faktoren ab, und zwar von der Konstanz der Schichtdicke der Platten (63), vom Abstand zwischen Plattenoberfläche und der Blendenöffnung des Methandurchflußzählers (62), von der Trägheit der Anzeige (64), von der positiven elektrostatischen Aufladung der Adsorbensoberfläche während der Messung (65) und von der Verteilung der Substanz in der Adsorbenschicht. Obwohl industriell vorgefertigte und damit sehr gleichmäßige Platten verwendet wurden, und obwohl versucht wurde, durch günstige Kombination der Vorschubgeschwindigkeit der Dünnschichtplatte und der Trägheit der Anzeige die Fehler durch elektrostatische Aufladung und Verzeichnung des Peaks möglichst gering zu halten, traten schon bei Vergleichen von Chromatogrammen, in denen 50% der gesamten Radioaktivität im Cerebrosidsulfat- und 50%

im Cerebrosid-Fleck enthalten waren, maximale Abweichungen von $\pm 7\%$ auf. Die maximalen Abweichungen stiegen auf $\pm 20\%$, wenn der Cerebrosid-Fleck nur 5% und der Cerebrosidsulfat-Fleck 95% der Gesamtaktivität enthielt, und sie stiegen bis etwa $\pm 50\%$, wenn die Aktivität im Cerebrosid-Fleck weniger als 2% der auf die Dünnschichtplatte applizierten Aktivität betrug. Für kinetische Messungen sind aber gerade die Bestimmungen geringer Umsätze wichtig, daher mußten 7-fach Bestimmungen durchgeführt werden, um zuverlässige Mittelwerte zu erhalten. Da die Methode darüberhinaus sehr zeitraubend ist, wurde die Untersuchung der Kinetik der Cerebrosidsulfatase-Aktivität des Enzyms im Allgemeinen nur mit Endpunktbestimmungen durchgeführt und nur in Einzelfällen wurde die Zeit-Umsatz-Kurve der Reaktion ermittelt.

In letzter Zeit sind weitere Verfahren zur Bestimmung der Cerebrosidsulfatase-Aktivität der Sulfatase A bekannt geworden, die auf der Titration der durch die Sulfatabspaltung freiwerdenden Protonen im pH-Stat (33) bzw. auf der Messung der Radioaktivität von ^{35}S -Sulfat, dem Produkt der enzymatischen Hydrolyse, das durch Phasenverteilung aus dem Inkubationsansatz isoliert worden ist (31, 34), beruhen. Die Verfahren haben die Nachteile eines erheblich höheren Enzym- und Substratverbrauches bzw. eines größeren zeitlichen und technischen Aufwandes, sie sind aber auf Grund der höheren Meßgenauigkeit, besonders bei geringen Umsätzen, dem hier verwendeten Verfahren überlegen.

B VI 3. Zeit-Umsatz-Kurve

Die Zeit-Umsatz-Kurve der Cerebrosidsulfatase-Reaktion des Enzyms zeigt einen ähnlichen Verlauf wie die entsprechende Kurve der Arylsulfatase-Reaktion (Abb. 20). Auch während der Cerebrosidsulfatase-Reaktion wird das Enzym fortschreitend inaktiviert. Daß diese Inaktivierung nicht auf eine Denaturierung des Enzyms zurückzuführen ist, zeigen Abs. B III und B V 2. Auch auf die Reduktion der Substratkonzentration im Inkubationsansatz und auf die Hemmung durch die freigesetzten Reaktionsprodukte kann das Absinken der enzymatischen Aktivität nicht allein zurückgeführt werden. In der in Abb. 20 dargestellten Zeit-Umsatz-Kurve ist die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion nach 30 min auf etwa 33% ihres Anfangswertes abgesunken, während die Substratkonzentration zum gleichen Zeitpunkt noch 86% der Ausgangskonzentration und die Konzentration an Sulfat-Anionen und Cerebrosid $14\text{ }\mu\text{M}$ betragen. Die Reaktionsgeschwindigkeiten wurden in diesem Fall durch Anlagen der Tangente an

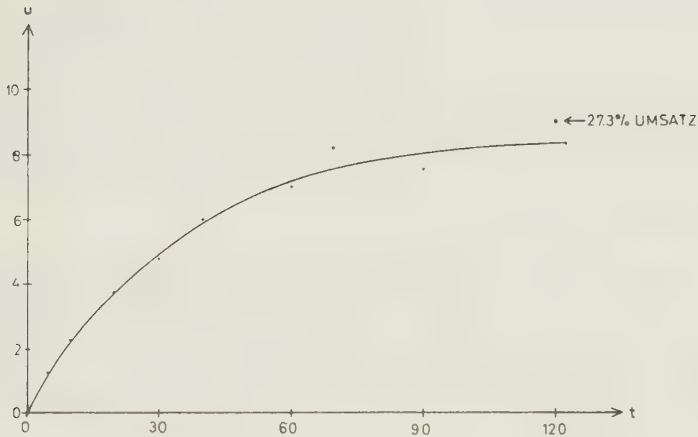


Abb. 20: Zeit-Umsatz-Kurve der Cerebrosidsulfatase-Reaktion der Sulfatase A. Ordinate: Umsatz u (nMol Cerebrosid/ μ g Protein); Abszisse: Inkubationszeit t (min). Inkubationsbedingungen: 0,01 M Natriumformiat, pH 5,3; 0,1 mM Cerebrosidsulfat; 2,8 μ g/ml Protein. Die Umsätze nach 30 bzw. 120 min Inkubation entsprechen 14% bzw. 27% des eingesetzten Substrates.

die Zeit-Umsatz-Kurve in den Punkten $t = 0$ min und $t = 30$ min abgeschätzt.

Ein Vergleich der Inaktivierungsgeschwindigkeiten zeigt allerdings, daß das Enzym in der Arylsulfatase-Reaktion erheblich schneller seine Aktivität verliert als in der Cerebrosidsulfatase-Reaktion: Unter etwa gleichen Bedingungen (0,01 M Natriumformiat, etwa das 1,7-fache der scheinbaren Michaeliskonstanten als Substratkonzentration (siehe Abs. B IV 3 d und Abs. B VI 6)) hat das Enzym nach einer Inkubationszeit von 30 min in der Cerebrosidsulfatase-Reaktion noch etwa 33% seiner Anfangsaktivität, in der Arylsulfatase dagegen nur noch 3,7%. Zur Berechnung der enzymatischen Aktivität in der Arylsulfatase-Aktivität dienen die Werte in Tab. VII.

Die Zeit-Umsatz-Kurven der Cerebrosidsulfatase-Reaktion wurden in der Regel durch Bestimmungen von Umsätzen zwischen 5 bis 50% des eingesetzten Substrates erstellt, da Messungen von Umsätzen unter 5% mit einem zu großen

Fehler behaftet waren (siehe Abs. B VI 2). Bei so hohen Umsätzen muß damit gerechnet werden, daß Faktoren wie die Reduktion der Substratkonzentration und Hemmung der enzymatischen Aktivität durch die Reaktionsprodukte den gemessenen Wert beeinflussen, wenn sie auch mit Sicherheit nicht allein für die Inaktivierung des Enzyms verantwortlich sind. Es erschien aus diesem Grunde nicht sinnvoll, die in Abs. B IV 1 beschriebene Bestimmung der Parameter der enzymatischen Reaktion auch auf die Cerebrosidsulfatase-Reaktion der Sulfatase A anzuwenden.

Die Cerebrosidsulfatase-Reaktion des Enzyms ist im Gegensatz zur Arylsulfatase-Reaktion nicht durch Sulfat-Anionen reaktivierbar. Der Zusatz von Natriumsulfat während der Inkubation bewirkt lediglich eine in ihrer Stärke von der Sulfatkonzentration abhängige Hemmung der Reaktion, und weder eine Reaktivierung noch eine nachfolgend konstante Reaktionsgeschwindigkeit konnten beobachtet werden.

B VI 4. pH-Profil

Das pH-Optimum der Cerebrosidsulfatase-Reaktion der Sulfatasen A aus Schweinenieren (27), menschlichen Fibroblasten (34) und Rinderleber (33) ist mit pH 4,5 angegeben worden. In diesen Fällen ist das pH-Optimum durch Inkubation der Sulfatase A in 0,1 bis 0,5 M Puffern und in Gegenwart von Aktivatoren ermittelt worden. Das pH-Profil der Cerebrosidsulfatase-Reaktion in 0,05 M Natriumformiat bestätigt diese Befunde (Abb. 21a). Wird das Enzym jedoch in verdünnteren Puffern inkubiert, so verschiebt sich das Optimum unter gleichzeitiger Erhöhung des Umsatzes zu alkalischeren Werten und liegt bei 0,01 M Natriumformiat-Konzentration etwa bei pH 5,3. Bei Pufferkonzentrationen unter 0,01 M ändert sich das pH-Optimum nicht mehr wesentlich, der Umsatz dagegen nimmt ab.

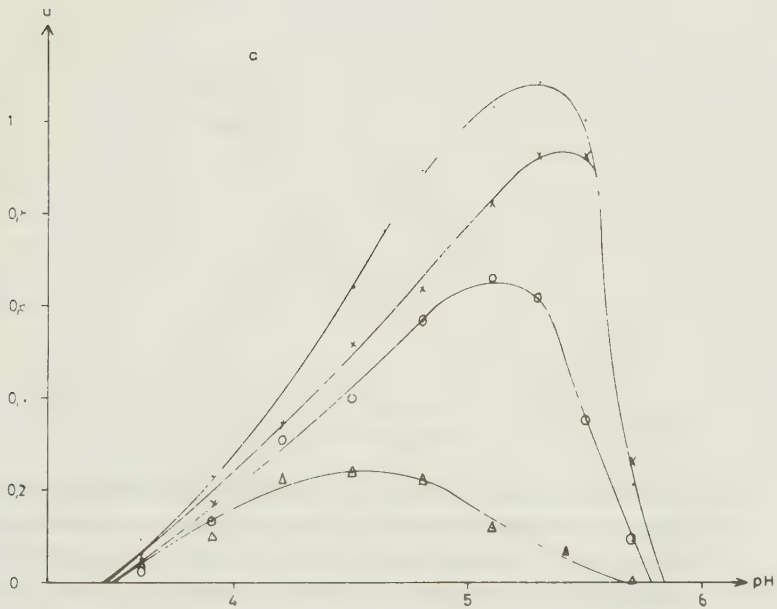


Abb. 21a: pH-Abhängigkeit der Cerebrosidsulfatase-Aktivität. Ordinate: Umsatz u (nMol Cerebrosid / μg Protein und 5 min), Abszisse: pH. Inkubationsbedingungen: 0,1 mM Cerebrosidsulfat; 32,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Protein; Inkubationszeit: 5 min. Puffer: x - x 0,005 M; · - · 0,01 M; o - o 0,02 M; — 0,04 M Natriumformiat

Die Zeit-Umsatz-Kurven der Cerebrosidsulfatase-Reaktion in 0,01 M Natriumformiat bei verschiedenen pH-Werten (Abb. 21b) zeigt, daß dieses pH-Optimum über den gesamten Meßzeitraum mindestens für die Umsatzwerte zwischen 5 und 60 min Inkubationszeit gültig ist. Ob es jedoch auch für die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion gilt, kann aus den vorliegenden Meßdaten nicht entschieden werden. Da das Enzym z.B. bei pH 5,7 deutlich schneller inaktiviert wird als bei pH 4,2, erscheint es nicht ausgeschlossen, daß das pH-Optimum der Anfangsgeschwindigkeit bei pH-Werten über 5,3 liegt.

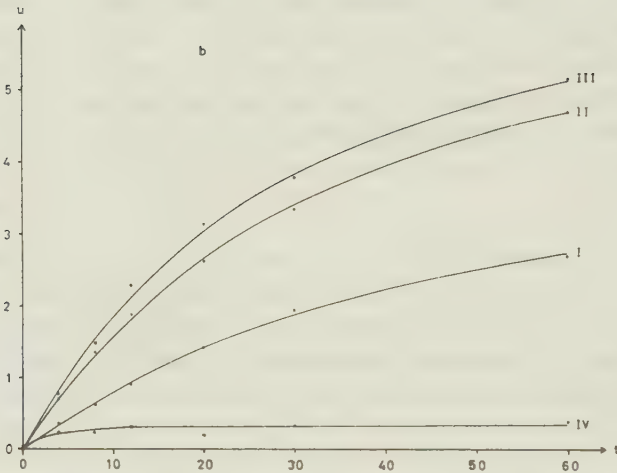


Abb. 21 b: Zeit-Umsatz-Kurve der Cerebrosidsulfatase-Reaktion in Abhängigkeit vom pH-Wert. Ordinate: Umsatz u (nMol Cerebrosid / μg Protein); Abszisse: Inkubationszeit t (min). Inkubationsbedingungen: 0,1 mM Cerebrosidsulfat; 7,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Protein; 0,01 M Natriumformiat; pH-Werte: I = 4,2; II = 4,8; III = 5,3; IV = 5,7.

B VI 5. Einfluß der Pufferkonzentration

Wie schon aus Abb. 17 und Abs. B V 1 hervorgeht, hängt die Cerebrosidsulfatase-Aktivität des Enzyms sehr stark von der Pufferkonzentration im Inkubationsansatz ab. Abb. 22, die Darstellung der Zeit-Umsatz-Kurve vor der enzymatischen Reaktion bei pH 5,3 und unterschiedlichen Pufferkonzentrationen, läßt auch in diesem Fall keine exakten Schlüsse auf die Anfangsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Natriumformiat-Konzentration zu. Jedoch scheint das Enzym im Gegensatz zur Arylsulfatase-Reaktion (Abs. B IV 3 d) nicht durch steigende Pufferkonzentrationen gegen die Inaktivierungsreaktion stabilisiert zu werden.

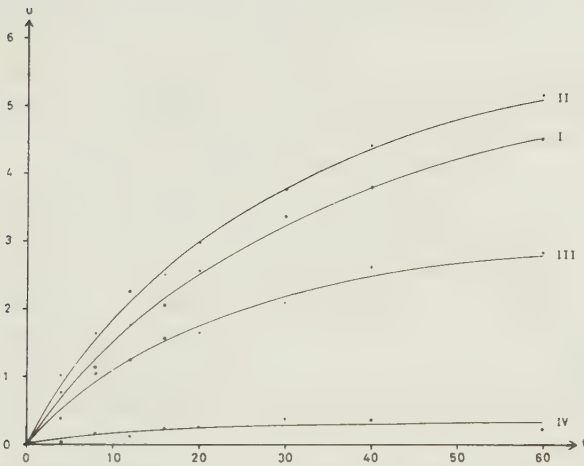


Abb. 22: Zeit-Umsatz-Kurve der Cerebrosidsulfatase-Reaktion in Abhängigkeit von der Natriumformiat-Konzentration. Ordinate: Umsatz u (nMol Cerebrosid / μg Protein); Abszisse: Inkubationszeit t (min). Inkubationsbedingungen: 0,1 mM Cerebrosidsulfat; 7,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Protein; Puffer: I 0,01 M; II: 0,005 M; III 0,02 M; IV: 0,04 M Natriumformiat, pH 5,3.

B V 6. Relation zwischen Substratkonzentration und enzymatischer Aktivität

Abb. 23 a zeigt die Michaelis-Menten-Kurve der Cerebrosidsulfatase-Reaktion in 0,01 M Natriumformiat-Puffer bei einer Inkubationszeit von 5 min. Die entsprechende Lineweaver-Burk-Kurve ist in Abb. 23 b dargestellt.

Da die mathematische Beziehung zwischen Umsatz und Inkubationszeit für die Cerebrosidsulfatase-Reaktion nicht bestimmt werden konnte, war es nicht möglich, zu prüfen, ob die Umsätze bei verschiedenen Substratkonzentrationen bei unendlicher Inkubationszeit einen gemeinsamen Grenzwert haben, wie das in der Arylsulfatase-Reaktion der Fall ist. Es muß jedoch festgehalten werden, daß auch die Cerebrosidsulfatase-Reaktion einer normalen Michaelis-Menten-

Kinetik gehorcht.

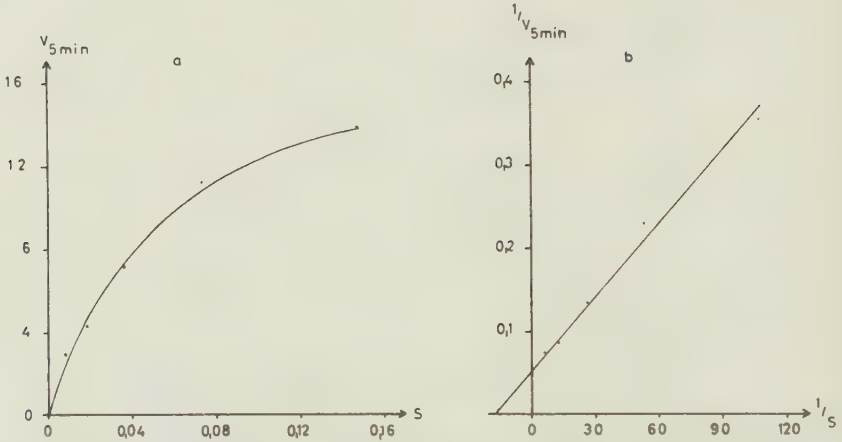


Abb. 23: a) Michaelis-Menten-Kurve der Cerebrosidsulfatase-Reaktion. Ordinate: Über 5 min gemittelte Reaktionsgeschwindigkeit $v_{5\text{min}}$ (nMol Cerebrosid / μg Protein $\cdot$ 5 min). Abszisse: Substratkonzentration s (mM Cerebrosidsulfat). Inkubationsbedingungen: 0,01 M Natriumformiat, pH 5,3; 14,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Protein.

b) Lineweaver-Burk Darstellung zu Abb. 23 a).

Die scheinbare Michaeliskonstante, die sich aus Abb. 23 b berechnen lässt, ist 0,06 mM Cerebrosidsulfat. In Gegenwart von Taurodesoxycholat als Aktivator und in 0,2 M Natriumacetat-Puffer, pH 4,5, sind für die menschliche Sulfatase A aus Fibroblasten-Kulturen scheinbare Michaeliskonstanten zwischen 0,1 und 0,2 mM Cerebrosidsulfat bestimmt worden (34) während für die Sulfatasen A aus Schweinenieren 0,105 mM Cerebrosidsulfat (0,2 M Natriumacetat-Puffer pH 4,5, natürlicher Aktivator (27)) und aus Rinderlebern in Abhängigkeit von der Taurodesoxycholat-Konzentration 0,03 bis 0,3 mM Cerebrosidsulfat (1 bis 6 mM Taurodesoxycholat, 0,5 M Natriumacetat, pH 4,5 (33)) als scheinbare Michaeliskonstanten bestimmt worden sind.

B VI 7. Hemmung der Cerebrosidsulfatase-Aktivität durch Natriumsulfat, Nitrocatecholsulfat und Natriumformiat

Die Hemmwirkung von Natriumsulfat und Nitrocatecholsulfat wurde in 0,01 M, die von Natriumformiat in 0,005 M bis 0,02 M Puffern, pH 5,3 überprüft. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurden, wie schon in Abs. B VI 6 beschrieben, aus dem Umsatz nach 5 min Inkubation berechnet. Das Enzym wird durch Natriumsulfat und Nitrocatecholsulfat nicht-kompetitiv gehemmt (Abb. 24 a, b), die Hemmkonstanten sind 4,51 mM für Natriumsulfat und 0,43 mM für Nitrocatecholsulfat, jeweils bei 0,01 M Pufferkonzentration. Auch für die Cerebrosidsulfatase-Reaktion von Sulfatasen A aus menschlichen Fibroblasten und Rinderleber ist nicht-kompetitive Hemmung durch Sulfat festgestellt worden. Die Hemmkonstanten unter den von Porter et al. (34) bzw. Jerfy und Roy (33) angewendeten Bedingungen (siehe Abs. B VI 6) sind 1 mM für das menschliche Enzym bzw. 0,46 mM für das Enzym aus Rinderleber. Ursache für die Differenzen zwischen den Hemmkonstanten dürften in erster Linie die sehr unterschiedlichen Inkubationsbedingungen sein.

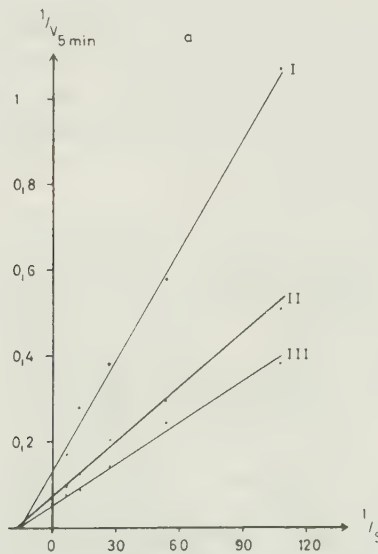


Abb. 24 a

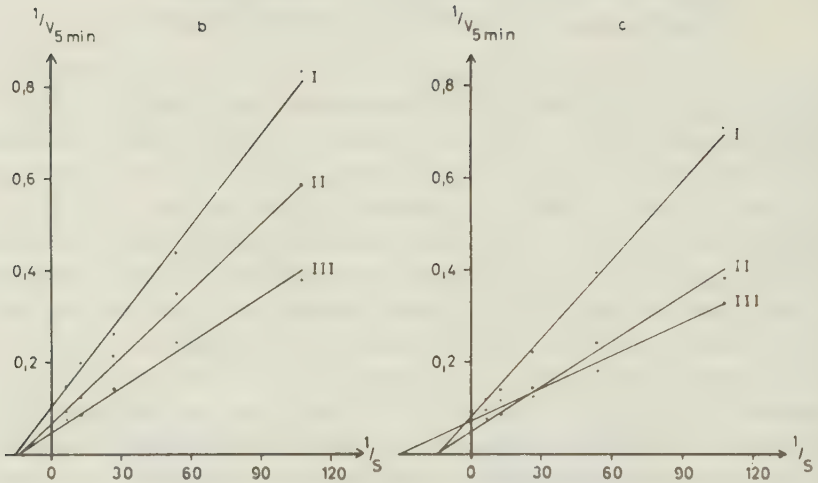


Abb. 24 a - c: Einfluß von Na_2SO_4 , NCS und Natriumformiat auf die Lineweaver-Burk Kurven der Cerebrosidsulfatase-Reaktion. Ordinaten: Reziprokwerte der über 5 min gemittelten Reaktionsgeschwindigkeiten $1/v_{5\text{min}}$ ($\text{nMol Cerebrosid}^{-1} \cdot \mu\text{g Protein} \cdot 5 \text{ min}$), Abszissen: Reziprokwerte der Cerebrosidsulfat-Konzentrationen $1/s$ (mM^{-1}). Inkubationsbedingungen: 0,01 M Natriumformiat, pH 5,3; 14,2 $\mu\text{g/ml}$ Protein; Inkubationszeit: 5 min.

- a) Einfluß von Na_2SO_4 . Na_2SO_4 -Konzentration: I: 5 mM; II: 2mM; III: 0 mM;
- b) Einfluß von NCS. NCS-Konzentrationen: I: 0,5 mM; II: 0,2 mM; III: 0 mM.
- c) Einfluß von Natriumformiat. Natriumformiat-Konzentrationen: I: 20 mM; II: 10 mM; III: 5 mM.

Hemmkonstante für Nitrocatecholsulfat sind in der Literatur nicht angegeben.

Der Modus der Hemmung der Cerebrosidsulfatase-Aktivität durch Natriumformiat ist komplizierter (Abb. 24 c). Über 0,01 M Pufferkonzentration liegt

offenbar nicht-kompetitive Hemmung vor, bei Natriumformiat-Konzentrationen niedriger als 0,01 M scheint sich ein ähnlicher Effekt auszuprägen, wie er schon bei der Untersuchung des Einflusses der Pufferkonzentration auf die Arylsulfatase-Aktivität beobachtet worden ist (s. Abb. 11b): Bei niedriger Substratkonzentration tritt eine Inhibierung der enzymatischen Aktivität auf, die bei höherer Substratkonzentration (ab 0,045 mM Kerasinsulfat) in eine Aktivierung umschlägt. Da noch keine Methode vorliegt, die es erlaubt, Parameter der Cerebrosidsulfatase-Reaktion wie den maximalen Umsatz und die Anfangsgeschwindigkeit mit einiger Genauigkeit zu bestimmen, können diese Phänomene noch nicht befriedigend erklärt werden.

B VII 1. Vergleich des Einflusses von Lipiden und Proteinen auf die Arylsulfatase- und auf die Cerebrosidsulfatase-Aktivität

Die Cerebrosidsulfatase-Aktivität der Sulfatase A wird durch eine Reihe von amphiphilen Lipiden (26) und durch Proteine (29, 31) gehemmt (Tab. VIII).

Tabelle VIII

Wirkung von Lipiden und Proteinen auf die Arylsulfatase- und die Cerebrosidsulfatase-Reaktion der Sulfatase A. Inkubationsbedingungen für die Arylsulfatase-Reaktion: 5 mM NCS; 0,01 M Natriumformiat, pH 5,3; 1,25 µg/ml Enzymprotein; Inkubationszeit: 5 min. Inkubationsbedingungen für die Cerebrosidsulfatase-Reaktion: 0,1 mM Cerebrosidsulfat; 0,01 M Natriumformiat, pH 5,3; 12,2 µg/ml Enzymprotein, Inkubationszeit: 20 min. Substrat und Lipide wurden gemeinsam dispergiert.

Substanz	Konzentration	% der Ausgangsaktivität	
		Cerebrosidsulfatase-Reaktion	Arylsulfatase-Reaktion
Psychosin	0,1 mM	0	124,7
Lecithin	0,1 mM	20,6	154,6
Sphingomyelin	0,1 mM	28,9	143,0
Inositphosphatid	0,1 mM	23,3	93,8
Cerebrosid	0,1 mM	45,2	136,4
Ceramid	0,1 mM	72,8	111,7
Albumin	25 µg/ml	4,4	147,2
(Rinderserum)			
Cytochrom C	25 µg/ml	42,5	149,0
(Pferdeherz)			
γ-Globulin	25 µg/ml	36,2	145,7
(Humanserum)			

Das Ausmaß der Hemmung durch die einzelnen Lipide ist unterschiedlich: Psychosin, das als einzige der Substanzen eine freie Aminogruppe trägt, hemmt sehr stark. Sphingomyelin und Lecithin, deren hydrophiler Anteil in beiden Fällen aus einem Zwitterion aus einer Phosphat- und einer quartären Amino-Gruppe besteht, inhibieren ebenfalls deutlich. Die Hemmung ist weniger ausgeprägt bei Ceramid und Kerasin, die keine ionischen Gruppen tragen.

Auf die Arylsulfatase-Reaktion der Sulfatase A wirken die genannten amphiphilen Lipide aktivierend.

Eine Ausnahmestellung nimmt Inositphosphatid ein, das als einziges Lipid die Cerebrosidsulfatase-Reaktion stark inhibiert und gleichzeitig die Arylsulfatase-Reaktion, wenn auch nur geringfügig, hemmt.

Die inhibitorische Wirkung von Albumin wurde schon von Percy et al. (31) beschrieben. Auch andere Proteine wie Cytochrom C und γ -Globulin hemmen in

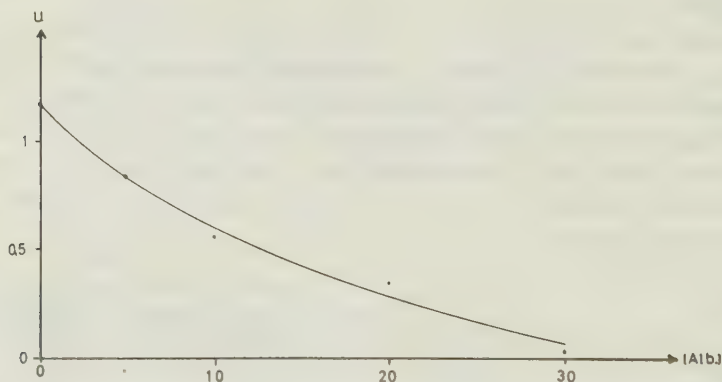


Abb. 25: Einfluß von Rinder-Serumalbumin auf die Cerebrosidsulfatase-Aktivität der Sulfatase A. Ordinate: Umsatz u (nMol Cerebrosid / μg Protein $\cdot$ 5 min), Abszisse: Albumin-Konzentration (Alb.) ($\mu\text{g}/\text{ml}$). Inkubationsbedingungen: 0,01 M Natriumformiat, pH 5,3; 0,1 mM Cerebrosidsulfat; 32,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Protein; Inkubationszeit: 5 min.

ähnlicher Weise und aktivieren gleichzeitig die Arylsulfatase-Aktivität des Enzyms. Die Abhängigkeit der Hemmung der Cerebrosidsulfatase-Reaktion von der Albumin-Konzentration gibt Abb. 25 wieder.

B VII 2. Vergleich der Umsätze in der Arylsulfatase- und in der Cerebrosidsulfatase-Reaktion

Wenn die beiden untersuchten Reaktionen der Sulfatase A, die Hydrolyse von Nitrocatecholsulfat und von Cerebrosidsulfat, qualitativ auch eine Reihe von Ähnlichkeiten aufweisen, so werden sie doch von Faktoren wie der Inkubationszeit, der Puffer- und Substratkonzentration oder der Anwesenheit von Fremdproteinen quantitativ sehr unterschiedlich beeinflusst. Der Quotient zwischen den Umsätzen in den zwei Reaktionen hängt dementsprechend sehr stark von den Bedingungen ab, unter denen das Enzym inkubiert worden ist. In Tab. IX werden die Umsätze unter den für die Cerebrosidsulfatase-Aktivität des Enzyms optimalen Bedingungen verglichen. Die Werte für den Umsatz bei Substratsättigung nach 5 min Inkubationszeit wurden Abb. 17 und 23 a entnommen.

Tabelle IX

Vergleich der Umsätze in der Cerebrosidsulfatase und Arylsulfatase-Reaktion. Inkubationszeit: 5 min.

Pufferkonz. (M)	pH	Enzym- konz. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Substrat	Substrat- umsatz ($\text{nMol}/\mu\text{g}$ Protein u. 5 min)	Bemer- kung
0,01	5,3	3,125	NCS, Substr. sättigung	17,2	
0,01	5,3	14,2	CS, Substr. sättigung	6,67	
0,2	5,0	1,25	5 mM NCS	150	Inkubations- bedingungen nach Baum et al. (40)

Nach den Inkubationsbedingungen nach Baum et al. (40) wird die Aktivität des Enzyms sehr häufig bestimmt, so daß Zeile III der Tabelle den Vergleich zu

anderen Werten erlaubt. Gleichzeitig verdeutlicht Zeile III die Bedeutung der Versuchsbedingungen für einen Vergleich des Substratumsatzes in den beiden Reaktionen: Bei Pufferkonzentrationen, in denen das Enzym für die Aktivitätsbestimmung nach Baum et al. (40) inkubiert wird, zeigt es gegenüber Nitro-catecholsulfat eine hohe, gegenüber Cerebrosidsulfaten aber keine meßbare Aktivität, wenn es nicht durch Aktivatoren wie Natriumtaurodesoxycholat (33, 34), Natriumcholat (31) oder den physiologischen Aktivator (27 - 29) aktiviert wird.

C. DISKUSSION

Die Anreicherung der menschlichen Sulfatase A wurde in Anlehnung an Verfahren durchgeführt, die von Nichol und Roy (44) und von Bleszinsky (45) für die Isolierung von Sulfatasen A aus Rinderorganen beschrieben worden sind. Ein Teil der Anreicherung ist in Gegenwart von Triton X-100 durchgeführt worden, da damit Verluste, die bei der Elektrofokussierung (47; A.B. Roy, persönliche Mitteilung) und der Sephadex-Filtration gereinigter Enzympräparationen entstehen, zumindest zum Teil vermieden werden konnten. In der Elektrofokussierung zeigte die menschliche Sulfatase A einen isoelektrischen Punkt von etwa pH 4,6. Er liegt damit, wie die isoelektrischen Punkte der bisher untersuchten Sulfatasen A aus anderen menschlichen Geweben (pH 4,3 bis 4,8) (14, 47), aus Schweinenieren (pH 4,4) (41), aus Rinderleber (pH 3,8) (A.B. Roy, persönliche Mitteilung) und aus der Leber des roten Känguruhs (pH 5,1 bis 5,4) (17) im sauren pH-Bereich.

Die Anreicherung führte zu einer in destilliertem Wasser löslichen Enzympräparation, in der nach Elektrophorese und Anfärben mit Amidoschwarz keine Verunreinigungen festgestellt werden konnten. Die Elektrophorese zeigte vor allem, daß die Präparation keine Sulfatase B, die die Untersuchung der Sulfatase A auf Grund ähnlicher katalytischer Eigenschaften stören kann, enthielt.

Das Molekulargewicht der menschlichen Sulfatase A lag bei pH 7,5 mit 100 000 bis 110 000 im gleichen Bereich wie das entsprechende Enzyme aus den Geweben des Rindes und des roten Känguruhs (15, 17). Wie die Sulfatase A aus Rinderleber (46) aggregiert auch das menschliche Enzym bei pH 4,5 und einer Pufferstärke von 0,1 M zu Oligomeren. Ob dabei auch das Tetramere entsteht, konnte allerdings nicht nachgewiesen werden.

Bei pH-Werten zwischen 5,3 und mindestens 7,5 ist die Sulfatase A stabil. Unterhalb pH 5,3 wird das Enzym irreversibel inaktiviert, und zwar um so schneller, je niedriger der pH-Wert ist. Für die Geschwindigkeit, mit der die enzymatische Aktivität zerstört wird, ist neben dem pH-Wert auch die Konzentration des Puffers maßgebend: Nach 30 min Inkubation bei pH 4 ist die enzymatische Aktivität in 0,1 M Natriumformiat zu 22%, in 0,4 M Puffer zu 60% und in 0,8 M Puffer zu 70% verlorgen gegangen. Die Irreversibilität der Inaktivierung, ihre Abhängigkeit von der Ionenstärke (66) und die Tatsache, daß die

Sulfatase A aus Rinderleber in der Nähe ihres isoelektrischen Punktes (pH 3,8) schnell und irreversibel in heterogene Bruchstücke zerfällt (67), zeigen, daß das Enzym durch pH-Werte unter 5,3 denaturiert wird.

Im Unterschied zur pH-Denaturierung ist die Inaktivierung der Sulfatase A, die während ihrer Reaktion mit Arylsulfaten beobachtet wird, reversibel. Durch Inkubation des inaktivierten Enzyms bei 37°C in Puffern mit pH-Werten zwischen 6 und 8 und in Abwesenheit seiner Substrate wird es mit einer Halbwertszeit von etwa 4 h wieder in die native Form überführt (19, 39).

Wie schon in der Einleitung dargestellt, führt die substratbedingte Inaktivierung des Enzyms zu einer anomalen Beziehung zwischen Inkubationszeit und Umsatz an Substrat. Durch die Feststellung, daß die doppelt reziproke Darstellung der Zeit-Umsatz-Kurve der Reaktion der Sulfatase A mit Nitrocatecholsulfat eine Gerade ergibt, gelang es, die Beziehung zwischen Umsatz und Inkubationszeit mathematisch zu formulieren. Die Beziehung zwischen Umsatz und Inkubationszeit ist hyperbolischer Natur, und der Umsatz nähert sich bei unendlicher Inkubationszeit asymptotisch einem Grenzwert, dem "maximalen Umsatz", wenn das Enzym nicht durch andere Einflüsse reaktiviert wird. Daraus muß gefolgert werden, daß das inaktivierte Enzym in Abwesenheit der Reaktivatoren vollständig inaktiv ist.

Die Steigung der Zeit-Umsatz-Kurve zu einem beliebigen Zeitpunkt der Inkubation entspricht der Geschwindigkeit der Reaktion in diesem Punkt. Die Beziehung zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Inkubationszeit ist demnach durch die erste Ableitung der Zeit-Umsatz-Kurve du/dt gegeben, und damit läßt sich die Anfangsgeschwindigkeit dieser enzymatischen Reaktion erstmals mit einiger Genauigkeit bestimmen. Da das inaktivierte Enzym keine Restaktivität besitzt, sollte die Zeit, in der die Reaktionsgeschwindigkeit auf die Hälfte ihres Anfangswertes sinkt, der Halbwertszeit gleich sein, in der die Konzentration an aktivem Enzym auf die Hälfte ihres Ausgangswertes absinkt, und somit ein Maß für die Geschwindigkeit der Inaktivierungsreaktion darstellen.

Anhand der beschriebenen Beziehungen wurden die Einflüsse unterschiedlicher Faktoren auf die Parameter der Arylsulfatase-Reaktion menschlicher Sulfatase A überprüft.

Das pH-Optimum für die Spaltung von Nitrocatecholsulfat liegt bei alkalischen Werten als bisher angenommen (47, 49, 50). Gleichzeitig zeigt das Optimum eine Abhängigkeit von der Pufferstärke: Von etwa pH 6,1 in 0,8 M Imidazol-Salzsäure-Puffer erhöht es sich auf etwa pH 6,9 in 0,1 M Puffer. Bei pH-Werten höher als das Optimum fällt die Aktivität sehr stark ab. Diese Tendenz ist in 0,1 M Puffer am stärksten ausgeprägt (Abb. 4a-c). Das pH-Optimum für die katalytische Reaktion ist gleichzeitig der pH-Wert, bei dem auch die Reaktion, die zur Inaktivierung des Enzyms führt, die größte Geschwindigkeit aufweist (Abs. B IV 2 b).

Der maximale Umsatz, den das Enzym vor seiner vollständigen Inaktivierung erreichen kann, steigt mit sinkenden pH-Werten an, und zwar bis in den pH-Bereich, in dem das Enzym instabil ist (Abb. 5a-c). In diesem pH-Bereich wird der maximale Umsatz nicht allein durch die Geschwindigkeit bestimmt, mit der die Sulfatase A in ihrer Reaktion mit dem Substrat inaktiviert wird, sondern auch durch die Geschwindigkeit, mit der sie denaturiert wird. Mit weiterem Sinken des pH-Wertes gewinnt die letztere Reaktion immer mehr an Gewicht, so daß der maximale Umsatz ab pH 4,8 in 0,8 M bzw. pH 4,3 in 0,1 M Puffer wieder sinkt (Abs. B IV 2 d).

Bei der Untersuchung des Einflusses der Substratkonzentration auf die Aktivität des Enzyms wurde festgestellt, daß die Sulfatase A der Michaelis-Menten-Kinetik gehorcht (Abb. 10). Das Bild der Lineweaver-Burk-Darstellung der Michaelis-Menten-Kurve ändert sich qualitativ auch dann nicht, wenn ihr nicht die Anfangsgeschwindigkeiten der enzymatischen Reaktion zugrunde gelegt werden, sondern gemittelte Geschwindigkeiten, die sich durch Division der Umsätze nach bestimmten Inkubationszeiten durch diese Inkubationszeiten ergeben (Abb. 11b, 13; Abs. B IV 3 c, d). Allerdings werden die so ermittelten scheinbaren Michaeliskonstanten mit wachsender Inkubationszeit immer kleiner (Abb. 12). Sie sollten für das nicht reaktivierte Enzym asymptotisch gegen Null laufen, da der theoretische maximale Umsatz der enzymatischen Reaktion für alle Substratkonzentrationen gleich ist (Abb. 9; Abs. B IV 3 b).

Der Einfluß von Sulfat-Ionen auf die Michaelis-Menten-Kurve zeigt eindeutig kompetitive Hemmung (Abb. 13), wie sie auch für die Sulfatase A aus Rinderleber gefunden wurde. Die fehlende Hemmung durch Nitrocatechol und die kompetitive Hemmung durch Sulfat legen den Schluß nahe, daß die Hydrolyse von Nitrocatecholsulfat durch die Sulfatase A nach einem Uni-Bi-Mechanismus (68)

mit Sulfat als dem den reaktiven Komplex zuletzt verlassenden Produkt (69) abläuft.

Schwieriger ist der Einfluß von Natriumformiat auf die Michaelis-Menten-Kurve des Enzyms zu erklären. In diesem Fall überlagern sich in der Reaktion des nativen Enzyms zwei Effekte: Einerseits hemmt Natriumformiat die Anfangsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion (Abb. 4a-c, V_0 -Werte), andererseits bewirkt eine steigende Natriumformiat-Konzentration einen höheren maximalen Umsatz (Abb. 5a-c, $U_{\max}$ -Werte), verlangsamt also die Inaktivierungsreaktion (Abb. 4a-c, $t_{1/2}$ -Werte). Die Tatsache, daß Natriumformiat ein Inhibitor der enzymatischen Reaktion ist, geht auch aus Abb. 11a und b hervor, und die lineare Proportionalität zwischen scheinbarer Michaeliskonstante und Pufferkonzentration deutet auf kompetitive Hemmung des Enzyms durch den Puffer hin (51), wenn diese Art der Hemmung damit auch keineswegs bewiesen ist. Die Affinität des Enzyms zu Natriumformiat ist wesentlich geringer als zu Sulfat oder zu Nitrocatecholsulfat (Tab. V, Abs. B IV 3 e).

Die Untersuchung der Einwirkung unterschiedlicher Pufferkonzentrationen bei einer konstanten Substratkonzentration von 5 mM bestätigt den Befund, daß der maximale Umsatz und die Halbwertszeit der Reaktion mit steigender Ionenstärke größer werden (Abb. 14). Darüberhinaus wird ein weiterer Effekt beobachtet: Bis zu einer Natriumformiat-Konzentration von 0,1 M steigt die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion, bei höheren Pufferkonzentrationen dagegen sinkt sie wieder. Dieser Effekt kann anhand Abb. 11 leicht erklärt werden: Durch steigende Pufferkonzentrationen wird die Reaktionsgeschwindigkeit bei niedriger Substratkonzentration erniedrigt und die scheinbare Michaelis-Menten-Konstante erhöht. Zugleich aber wird auch die maximale Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion bei Substratsättigung erhöht, was letztlich einer gleichzeitigen Hemmung und Aktivierung der Reaktion durch Natriumformiat entspricht. Der Verlauf der Kurve der Anfangsgeschwindigkeit der Arylsulfatase-Reaktion bei einer Substratkonzentration von 5 mM (Abb. 14) ist auf die Überlagerung dieser beiden Effekte zurückzuführen.

Ähnlich wie Natriumformiat verhalten sich auch Natriumacetat, -propionat und -chlorid (Abs. B IV 3 h), wobei die stabilisierende Wirkung des Pufferanions und seine Affinität zum Enzym in der Reihe Formiat - Acetat - Propionat mit wachsender Kettenlänge abnehmen.

Die Ergebnisse der Untersuchung können anhand des Modells von Baum und Dodgson, das in der Einleitung erläutert worden ist, erklärt werden. Die Dauer der Inaktivierungsreaktion, deren Halbwertszeit je nach Inkubationsbedingungen zwischen 0,5 und 30 min liegt (Abb. 4a-c, Tab. IV), bestärkt die Vermutung, daß ihre Ursache in einer Konformationsänderung des primären Enzym-Substrat-Komplexes (ES) in eine modifizierte Form (FS) liegt (19, 39). Direkte Nachweise für eine solche Konformationsänderung konnten bisher noch nicht erbracht werden. Die Übereinstimmung der bisher untersuchten physikalischen Eigenschaften des nativen (E) und des modifizierten Enzyms (F) sagen dazu wenig aus, da diese Untersuchungen sich nur auf das Molekulargewicht, das Polymerisationsverhalten und den isoelektrischen Punkt bezogen, während vergleichende ORD- und NMR-Studien, mit denen eine Konformationsänderung wohl am ehesten nachgewiesen werden könnte, bisher noch nicht durchgeführt worden sind.

Nach dem Modell kann der ES-Komplex also auf zwei Arten weiterreagieren: Entweder er reagiert unter Beibehaltung der ursprünglichen Konformation des Enzyms über weitere Zwischenstufen, von denen der letzte wahrscheinlich ein Enzym-Sulfat-Komplex (ESO_4^{2-}) ist, zu nativem Enzym (E), Nitrocatechol (NC) und Sulfat (SO_4^{2-}) weiter (Hydrolysereaktion; $\text{ES} \rightleftharpoons \dots \rightarrow \text{ESO}_4^{2-} + \text{NC} \rightarrow \text{E} + \text{SO}_4^{2-}$), oder er reagiert über eine Konformationsänderung ($\text{ES} \rightarrow \text{FS}$) zu einem inaktiven Komplex (Inaktivierungsreaktion). Die Natur des inaktiven Komplexes ist unbekannt, jedoch lassen seine Reaktivierbarkeit durch Phosphate und die Produkte der enzymatischen Hydrolyse und die Art der unter dem Einfluß der Reaktivatoren ablaufenden enzymatischen Reaktion vermuten, daß es sich um einen Komplex aus einem modifizierten Enzym- und zwei Substratmolekülen (FS_2) handelt. Die Substrathydrolyse durch das modifizierte Enzym könnte dann über einen Sulfat-modifiziertes Enzym-Substrat-Komplex laufen ($\text{SO}_4^{2-}\text{FS}$) (19, 39). Da die native Sulfatase A keine Substrathemmung zeigt, kann die Existenz eines inaktiven ES_2 -Komplexes ausgeschlossen werden.

Die Hemmung der Arylsulfatase-Reaktion durch Puffer (Pu) deutet darauf hin, daß die Konzentration des ES-Komplexes in Gegenwart von Puffern erniedrigt wird, und zwar wahrscheinlich durch Bildung eines Enzym-Puffer-Komplexes (EPu).

Ein Diagramm dieses Reaktionsmodells, das zur größeren Klarheit stark vereinfacht ist und weder alle Enzym-Inhibitor-Komplexe, wie zum Beispiel

ESO_4^{2-} , FSO_4^{2-} und $\text{F}(\text{SO}_4^{2-})_2$, noch die stöchiometrischen Verhältnisse berücksichtigt, ist in Abb. 26 wiedergegeben.

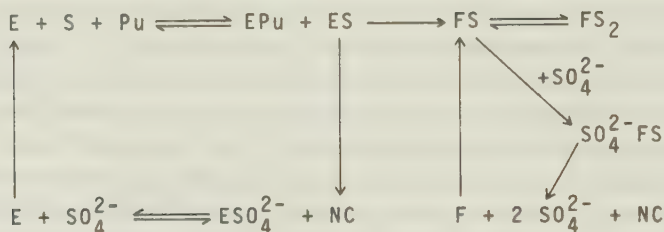


Abb. 26: Hypothetisches Schema der Arylsulfatase-Reaktion der Sulfatase A. Erläuterungen siehe Diskussion.

Im folgenden soll versucht werden, anhand dieses Modells die Effekte des pH-Wertes, der Puffer- und der Substratkonzentration auf die Parameter der Arylsulfatase-Reaktion der Sulfatase A zu erklären.

Unter der Voraussetzung der Michaelis-Menten-Theorie, daß die Bildung des primären Enzym-Substrat-Komplexes sehr viel schneller als die Folgereaktionen erfolgt, hängt die Konzentration an ES von den Gleichgewichtskonstanten der Reaktion $\text{E} + \text{S} \rightleftharpoons \text{ES}$ und $\text{E} + \text{Pu} \rightleftharpoons \text{EPu}$ ab. Von der Konzentration an ES und von der Geschwindigkeit, mit der die Konformationsänderung $\text{ES} \longrightarrow \text{FS}$ abläuft, hängt der Anteil an Enzym ab, der pro Zeiteinheit inaktiviert wird, während die Anfangsgeschwindigkeit der hydrolytischen Reaktion $\text{ES} \rightleftharpoons \dots \longrightarrow \text{E} + \text{SO}_4^{2-} + \text{NC}$ ebenfalls von der Konzentration an ES und zusätzlich von der Geschwindigkeit des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes dieser Reaktion abhängt. Der maximale Umsatz dieser Reaktion wird durch das Verhältnis des Anteils an ES, der die hydrolytische Reaktion durchläuft, zu dem Anteil, der zu FS weiterreagiert, bestimmt.

Bei pH-Werten, die größer als das Optimum sind, nimmt die Anfangsgeschwindigkeit mit steigendem pH stark ab, während die Halbwertszeit der enzymatischen Reaktion nur wenig zunimmt. Demnach ist das Sinken der Anfangsgeschwindigkeit in diesem pH-Bereich wahrscheinlich auf eine Verminderung der Geschwindigkeit der Hydrolysereaktion zurückzuführen, während die Kon-

zentration an ES und die Geschwindigkeit der Reaktion $ES \longrightarrow FS$ relativ konstant bleiben. Dafür spricht auch die Beobachtung, daß der maximale Umsatz trotz des leichten Anstiegs der Halbwertszeit deutlich weiter sinkt, daß sich also der Anteil an ES, der zu FS weiterreagiert, gegenüber dem Anteil, der die hydrolytische Reaktion durchläuft, deutlich erhöht.

Im pH-Bereich unterhalb des Optimums dagegen nehmen die Geschwindigkeit der Inaktivierung und die Anfangsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion in vergleichbarem Maße ab, was in beiden Fällen durch die Verringerung der ES-Konzentration mit sinkenden pH-Werten erklärt werden kann. Zugleich steigt der maximale Umsatz stark an, der Anteil des ES-Komplexes, der über die Hydrolysereaktion weiterreagiert, wird also im Vergleich zu dem, der die Konformationsänderung $ES \longrightarrow FS$ erfährt, immer größer.

Eine Erhöhung der Pufferkonzentration bewirkt zweierlei: Erstens wird der Anteil an ES, der die hydrolytische Reaktion durchläuft, gegenüber jenem, der der Inaktivierungsreaktion unterliegt, erhöht. Zweitens wird die Konzentration des ES-Komplexes durch die Konkurrenzreaktion $E + Pu \rightleftharpoons E Pu$ erniedrigt.

Der maximale Umsatz sollte, ebenso wie die Halbwertszeit der enzymatischen Reaktion, mit dem Ansteigen des Anteils an ES, der über die Hydrolysereaktion weiterreagiert, erhöht werden. Die Erniedrigung der ES-Konzentration sollte den maximalen Umsatz nicht beeinflussen, die Halbwertszeit jedoch weiter erhöhen. Dementsprechend wird eine Erhöhung dieser beiden Reaktionsparameter mit steigender Pufferkonzentration beobachtet (Abb. 14).

Auf die Anfangsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion sollten die beiden Effekte einen entgegengesetzten Einfluß ausüben; die Steigerung des Anteils an ES, der die Reaktionsfolge $ES \rightleftharpoons \cdots \longrightarrow E + SO_4^{2-} + NC$ durchläuft, sollte sie erhöhen, die Verminderung der ES-Konzentration sie erniedrigen. Da die Affinität des Enzyms zu Nitrocatecholsulfat sehr viel höher ist als zu Natriumformiat (Abs. B IV 3 c, d), überwiegt bei niedriger Pufferstärke der Einfluß auf die Reaktionsfolge $ES \rightleftharpoons \cdots \longrightarrow E + SO_4^{2-} + NC$: Die Anfangsgeschwindigkeit steigt mit wachsender Ionenstärke. Je höher die Pufferkonzentration wird, um so stärker wirkt sich die Erniedrigung der ES-Konzentration aus: Die Anfangsgeschwindigkeit erreicht ein Maximum und sinkt bei weiterer Steigerung der Pufferstärke wieder ab (Abb. 14). Der Einfluß der Puf-

ferkonzentration auf die ES-Konzentration sollte nach diesem Modell von der Substratkonzentration abhängen, und die Lage des Maximums der Anfangsgeschwindigkeit sollte bei Erniedrigung der Substratkonzentration zu geringeren Pufferstärken wandern. Dementsprechend liegt das Maximum bei einer Nitrocatecholsulfat-Konzentration von 5 mM bei 0,1 M Natriumformiat, während es bei 0,5 M Substratkonzentration unterhalb einer Pufferkonzentration von 0,05 M liegt (Abb. 11, 14).

Gleichzeitig wird durch diese Überlegung das Ansteigen der maximalen Geschwindigkeit bei Substratsättigung mit Erhöhung der Pufferstärke erklärt: Da der Puffer vermutlich kompetitiv hemmt (Abs. B IV 3 d), hat er keinen Einfluß auf die ES-Konzentration bei Substratsättigung; sein Einfluß auf die Anteile an ES, die in der Hydrolyse- bzw. in der Inaktivierungsreaktion weiterreagieren, bleibt jedoch bestehen, und die maximale Geschwindigkeit bei Substratsättigung sollte demnach mit der Pufferkonzentration ansteigen (Abb. 11).

Eine Änderung der Substratkonzentration bei konstanter Pufferstärke sollte sich nach dem Modell zwar auf die Konzentration des ES-Komplexes, nicht aber auf die Anteile an diesem Komplex, die in der Hydrolyse- bzw. in der Inaktivierungsreaktion weiterreagieren, auswirken. Daher muß erwartet werden, daß der maximale Umsatz unter diesen Bedingungen konstant bleibt, während bei steigender Substratkonzentration die Anfangsgeschwindigkeit ansteigt und die Halbwertszeit sinkt. Die Ergebnisse (Tab. IV, Abb. 10) bestätigen diese Überlegung.

Die enzymatische Aktivität der modifizierten Enzymform in Gegenwart von Sulfat-Anionen ist nicht weitergehend untersucht worden. Es wurde lediglich festgestellt, daß die Hydrolyse von Nitrocatecholsulfat, die durch diese Enzymform bewirkt wird, mit pH 5,7 (Abb. 7) das gleiche pH-Optimum hat wie die entsprechende Reaktion der Sulfatase A aus Rinderleber (39). Weiterhin wird auch in dieser Reaktion der Umsatz an Substrat durch steigende Pufferkonzentrationen erhöht (Abb. 15, 16).

Auf die Schwierigkeiten bei der Untersuchung der Reaktion der Sulfatase A mit Arylsulfaten wurde schon hingewiesen. Sie werden dadurch erhöht, daß bisher kein vergleichbarer Fall einer enzymatischen Reaktion, die automatisch mit der Inaktivierung des Enzyms verbunden ist, bekannt geworden ist. Kriterien, wie sie für die Produkthemmung erarbeitet worden sind, lassen sich eindeutig

nicht auf die Reaktion der Sulfatase A übertragen, aber auch Reaktionen, in denen die beteiligten Enzyme durch extreme pH-Werte, Temperaturen oder andere Einflüsse langsam irreversibel inaktiviert werden, führen nicht zu vergleichbaren Ergebnissen (70 - 72). Für einzelne Schritte des Modells jedoch existieren durchaus Beispiele. So ist sowohl kompetitive als auch nicht- und unkompetitive Hemmung enzymatischer Reaktionen durch Ionen, die von den jeweiligen Substraten extrem verschieden sind, beschrieben worden (73 - 76), und auch der Einfluß von Elektrolyten auf Konformationsänderungen in Proteinen ist bekannt (73 - 78). Konformationsänderungen sind die Grundlagen verschiedener Modelle, die von Koshland (79, 80), Monod (81, 82) und Lazdunski (78, 83) für die Reaktionen von aus Untereinheiten zusammengesetzten und, jedoch nicht ausschließlich, allosterischen Enzymen entwickelt worden sind. Es ist erwähnenswert, daß die Reaktion der alkalischen Phosphatase aus *Escherichia coli*, für die Lazdunski das Modell des Flip-Flop-Mechanismus entwickelt hat, eine Michaelis-Menten-Kinetik aufweist, und daß die maximale Geschwindigkeit ihrer Reaktion, deren geschwindigkeitsbestimmender Schritt die Dephosphorylierung des Enzym-Phosphat-Komplexes und die damit verbundene Konformationsänderung des Enzyms ist, durch Erhöhung der Ionenstärke des Inkubationspuffers signifikant erhöht wird (83).

Wenn sich so auch gewisse Übereinstimmungen mit anderen, wesentlich fundierteren Modellen enzymatischer Reaktionen ergeben, muß doch betont werden, daß das Modell der Reaktion der Sulfatase A mit Nitrocatecholsulfat weder als erwiesen noch als abgeschlossen betrachtet werden kann. Jedoch sollten weitere Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der Sulfatase A durch die Bestimmung der mathematischen Relation zwischen Umsatz und Inkubationszeit erleichtert werden.

Aus experimentellen Gründen konnte eine entsprechende Beziehung für die Reaktion der Sulfatase A mit ihren natürlichen Substraten, den Cerebrosidsulfaten, nicht aufgestellt werden. Daß die Cerebrosidsulfatase- und die Arylsulfatase-Reaktionen des Enzyms jedoch nach ähnlichen Mechanismen ablaufen, lassen Versuche vermuten, in denen die Sulfatase A mit Cerebrosidsulfat und Nitrocatecholsulfat gleichzeitig inkubiert wurde. Die Versuche zeigten, daß das Enzym unter Bedingungen, unter denen es Cerebrosidsulfat spaltet, von diesem in seiner Arylsulfatase-Aktivität stark gehemmt wird (Abb. 17). Bei steigender Pufferkonzentration wird die Hemmung geringer und schlägt bei einer Na-

triumformiat-Konzentration von etwa 0,08 M in eine Aktivierung um. Bei dieser Ionenstärke wird Cerebrosidsulfat nicht mehr durch das Enzym hydrolysiert, wenn dem Inkubationsansatz nicht Aktivatoren wie der natürliche Aktivator (27-29), Natriumtaurodesoxycholat (33, 34) oder Natriumcholat (31) zugefügt werden.

Sowohl die Hemmung als auch die Aktivierung der Arylsulfatase-Reaktion in Gegenwart von Cerebrosidsulfat wirkt sich in erster Linie auf die Anfangsgeschwindigkeit aus. Der maximale Umsatz an Nitrocatecholsulfat wird durch die Gegenwart von Cerebrosidsulfat nicht signifikant geändert. Wird das Enzym aber 30 min mit Cerebrosidsulfat vorinkubiert, so werden in der Arylsulfatase-Reaktion bei 0,01 M Natriumformiat-Konzentration die Anfangsgeschwindigkeit nochmals und nun auch sehr deutlich der maximale Umsatz herabgesetzt, obwohl das entstandene Cerebrosid die Arylsulfatase-Reaktion aktiviert (Tab. VIII). In 0,1 M Puffer ist kein Effekt der Vorinkubation zu beobachten (Tab. VII). Es muß daher angenommen werden, daß die Sulfatase A auch in ihrer Reaktion mit Cerebrosidsulfat inaktiviert wird. Diese Annahme wird durch den Verlauf der Zeit-Umsatz-Kurve der Cerebrosidsulfatase-Reaktion bestätigt (Abb. 20), die ebenfalls nicht linear ist, und deren Krümmung ebenso wenig wie der analoge Verlauf der Zeit-Umsatz-Kurve der Arylsulfatase-Reaktion durch die Reduktion der Substratkonzentration und durch Produkthemmung befriedigend erklärt werden kann (Abs. B VI 3). Das durch die Cerebrosidsulfatase-Reaktion inaktivierte Enzym verliert demnach seine Aktivität sowohl gegenüber Nitrocatecholsulfat als auch gegenüber Cerebrosidsulfat, ebenso wie das durch die Arylsulfatase-Reaktion inaktivierte Enzym seine Aktivität gegenüber Cerebrosidsulfaten verliert (33). Die Inaktivierung in Gegenwart von Cerebrosidsulfat ist jedoch deutlich langsamer als in Gegenwart von Nitrocatecholsulfat, und im Gegensatz zu Arylsulfatase-Reaktion kann die Cerebrosidsulfatase-Reaktion nicht durch Phosphate oder Sulfat reaktiviert werden (Abs. B VI 3).

Die Hemmung der Arylsulfatase-Aktivität durch Cerebrosidsulfat ist, ebenso wie die Hemmung der Cerebrosidsulfatase-Aktivität durch Nitrocatecholsulfat, nicht-kompetitiv. Das muß jedoch nicht bedeuten, daß beide Substrate von verschiedenen aktiven Zentren des Enzyms abgebaut werden (68). Die Beobachtung, daß Cerebrosidsulfat nur bei solchen Pufferkonzentrationen die Arylsulfatase-Reaktion hemmt, bei denen es auch gespalten wird, und die vergleichbaren

Anomalien der Zeit-Umsatz-Kurven der Arylsulfatase- und der Cerebrosidsulfatase-Reaktionen legen vielmehr den Schluß nahe, daß beide Substrate vom gleichen aktiven Zentrum der Sulfatase A gespalten werden, obwohl sie sich in ihrer Struktur und in ihren physikalischen Eigenschaften stark voneinander unterscheiden.

Während Nitrocatecholsulfat ein in Wasser monomolekular löslicher phenolischer Schwefelsäureester ist, handelt es sich bei Cerebrosidsulfat um ein amphiphiles Lipid (84), dessen hydrophober Ceramid-Anteil β -glycosidisch an eine hydrophile Galaktose-3-sulfat-Gruppe gebunden ist (85). In Wasser läßt Cerebrosidsulfat sich mindestens bis zur Konzentration von 0,2 mM zu optisch klaren, stabilen Solen dispergieren, in denen es in Form von Micellen vorliegt (86, 87). Die kritische micellare Konzentration von Cerebrosidsulfat ist noch unbekannt, und daher kann nicht mit Sicherheit entschieden werden, welche Form des Glycolipids das eigentliche Substrat der Sulfatase A darstellt. Da jedoch die kritische micellare Konzentration von Gangliosiden bei 0,1 mM liegt (88), und da Cerebrosid keine monomolekularen Lösungen bildet (84), muß angenommen werden, daß die kritische micellare Konzentration von Cerebrosidsulfat weit unter 0,1 mM liegt. Aus diesem Grund und aus der Beobachtung, daß die Lineweaver-Burk-Kurve der Cerebrosidsulfatase-Reaktion linear verläuft (Abb. 23, 24), erscheint es gerechtfertigt, davon auszugehen, daß das Cerebrosidsulfat im wesentlichen in seiner micellaren Form vorgelegen hat und in dieser Form abgebaut worden ist (89).

Die Unterschiede in der Struktur von Nitrocatecholsulfat und Cerebrosidsulfat lassen erwarten, daß sich auch die Art ihrer Bindung an das Enzymmolekül unterscheidet. Diese Bindung hängt außer von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Substrate ganz wesentlich von den Eigenschaften des Enzymproteins wie z.B. seiner Konformation oder seiner Ladung ab. Bei der Diskussion der Wirkung von Faktoren wie pH-Wert, Ionenstärke und Anwesenheit von Fremdlipiden und -proteinen auf die Cerebrosidsulfatase-Aktivität müssen daher Einflüsse sowohl auf das Enzymprotein als auch auf die Substratmicellen berücksichtigt werden.

So könnte der steile Abfall der Cerebrosidsulfatase-Aktivität zwischen pH 5,5 und 6 (Abb. 21) an einer Änderung der Ionisierung oder der Konformation der Substratbindungsstelle im Enzymmolekül liegen, er könnte jedoch auch in der Zustandsänderung des Substrates in diesem pH-Bereich, die sich in einer Än-

derung des Dipolmomentes und der Oberflächenspannung eines monomolekularen Cerebrosidsulfat-Filmes auf einer wäßrigen Phase äußert (90), begründet sein. Daß der steile Abfall nicht auf Veränderungen im aktiven Zentrum des Enzymmoleküls beruht, zeigt das pH-Profil der Arylsulfatase-Aktivität. Im übrigen zeigen die pH-Profile der Cerebrosidsulfatase-Reaktion den gleichen Trend wie die der Arylsulfatase-Reaktion (Abb. 4a-c): Mit abnehmender Pufferstärke wandert das Optimum zu alkalischeren Werten. Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß Abb. 4a-c und Abb. 21a nicht völlig vergleichbar sind: Für das pH-Profil der Arylsulfatase-Reaktion wurden die Anfangsgeschwindigkeiten bestimmt, während das pH-Profil der Cerebrosidsulfatase-Reaktion den Umsatz nach 5 minütiger Inkubation wiedergibt.

In Abb. 21 a und b, wie schon in Abb. 17, ist der sehr starke Einfluß der Pufferkonzentration auf die Cerebrosidsulfatase-Aktivität erkennbar, der sehr viel deutlicher ausgeprägt ist als der entsprechende Effekt auf die Arylsulfatase-Aktivität. Zumindest ab einer Konzentration von 0,01 M hemmt Natriumformiat die Cerebrosidsulfatase-Aktivität nicht-kompetitiv (Abb. 24c). Ganz ähnliche Ergebnisse erhielten Lipovac et al. (19) bei der Untersuchung der Reaktion einer Sialidase aus *Vibrio cholerae* mit Gangliosiden und Sialyllactose als Substraten. Sie führen diese Ergebnisse auf eine Konformationsänderung des Enzyms mit steigender Ionenstärke zurück, die zwar die Bindung des kleinen, hydrophilen Sialyllactose-Moleküls an das Enzym kaum beeinträchtigt, die Bindung und damit den Abbau der Gangliosidmicellen aber stark hemmt. Die Beobachtung, daß die Arylsulfatase-Reaktion bei höheren Ionenstärken nicht mehr durch Cerebrosidsulfat gehemmt wird (Tab. VII), unterstützt diese Hypothese.

Auch der Einfluß von Lipiden und Proteinen auf die Cerebrosidsulfatase-Aktivität ist auf eine Hemmung der Bindung der Substratmicellen an das Enzym und nicht auf einen Effekt auf das aktive Zentrum zurückzuführen (Tab. VIII). Cerebrosidsulfate bilden mit anderen Lipiden gemischte Micellen, deren Oberflächenladung von den ionischen Gruppen beider Lipide abhängt (92). Von den ionischen Gruppen der Fremdlipide hängt gleichzeitig das Ausmaß der Hemmung der Cerebrosidsulfatase-Reaktion ab (Abs. B VII 1), und die Hemmung könnte demnach in der Bildung gemischter Micellen, die die Substratbindung erschweren, begründet sein. Nach den vorliegenden Daten läßt sich jedoch auch eine direkte Einwirkung der Fremdlipide auf das Enzymprotein nicht ausschließen. In jedem Fall kann die Ausnahmestellung von Inositphosphatid (Abs. B VII 1) auf die zu-

sätzliche Hemmung des aktiven Zentrum durch die freien Phosphat-Gruppen zurückgeführt werden, die sich auch darin zeigt, daß Inositphosphatid als einziges der aufgeführten Lipide die Arylsulfatase-Aktivität hemmt.

Die Cerebrosidsulfatase-Reaktion gehorcht einer normalen Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. 23). Die scheinbare Michaelis-Konstante liegt bei 0,06 mM, sie ist also um den Faktor vier kleiner als die scheinbare Michaeliskonstante für die Arylsulfatase-Reaktion unter identischen Bedingungen.

Durch Natriumsulfat wird die Cerebrosidsulfatase-Aktivität nicht-kompetitiv gehemmt (Abb. 24a), die Hemmkonstante in 0,01 M Natriumformiat und bei 5 minütiger Inkubationszeit ist 4,51 mM. Nicht-kompetitive Hemmung durch Sulfat sind auch für die Cerebrosidsulfatase-Aktivitäten einer Sulfatase A aus menschlichen Fibroblasten und einer Sulfatase A aus Rinderleber in Gegenwart von Natriumtaurodesoxycholat als Aktivator gefunden worden (33, 34), und Jerfy und Roy (33) ziehen daraus den Schluß, daß in diesen Cerebrosidsulfat-Reaktionen nicht Sulfat sondern eine gemischte Taurodesoxycholat-Cerebrosidsulfat-Cerebrosid-Micelle den reaktiven Komplex als letztes verläßt.

Wenn Cerebrosidsulfat und Nitrocatecholsulfat auch mit hoher Wahrscheinlichkeit vom gleichen aktiven Zentrum der Sulfatase A und nach ähnlichen Mechanismen hydrolysiert werden, so führt der große Unterschied in den physikalisch-chemischen Eigenschaften der beiden Substrate doch zu Unterschieden in den kinetischen Eigenschaften der entsprechenden enzymatischen Reaktionen. Das Verhältnis der Cerebrosidsulfatase- zur Arylsulfatase-Aktivität hängt daher weitgehend von den Inkubationsbedingungen ab. So ist es unter optimalen Bedingungen für die Cerebrosidsulfatase-Reaktion 0,4. Wird jedoch die optimale Cerebrosidsulfatase-Aktivität mit der Arylsulfatase-Aktivität verglichen, die unter den Bedingungen nach Baum et al. (40) gemessen wird, so ist das Verhältnis 0,05 (Abs. B VII 2).

Damit hat sich gezeigt, daß die Sulfatase A, im Gegensatz zu bisherigen Befunden (33, 34), auch in Abwesenheit von Aktivatoren Cerebrosidsulfat spalten kann. Darüberhinaus liegt das Verhältnis Cerebrosidsulfatase- zur Arylsulfatase-Aktivität, wenn optimale Bedingungen für den Abbau der Cerebrosidsulfate gewählt werden, in der gleichen Größenordnung wie das entsprechende Verhältnis bei Anwendung von Aktivatoren. Als Verhältnis der Cerebrosidsulfatase-Aktivität, gemessen in 0,18 M Natriumacetat, pH 4,5, 0,107 mM Cerebrosid-

sulfat und in Gegenwart von 1 mg/ml Natriumcholat als Aktivator, zur Arylsulfatase-Aktivität, gemessen nach den Bedingungen von Baum et al. (40), haben Percy et al. (31) für eine Sulfatase A aus menschlichen Fibroblasten einen Wert von 0,08 erhalten.

Die Identität von Arylsulfatase A und Cerebrosidsulfatase ist durch diese Untersuchung weiter bestätigt worden, und gleichzeitig wurde festgestellt, daß das Enzym auch in seiner Reaktion mit Cerebrosidsulfat inaktiviert wird. Eine Diskussion des biologischen Sinns dieser Inaktivierung erscheint jedoch wenig sinnvoll, da zweifelhaft ist, ob die Sulfatase A auch in ihrer Reaktion "in vivo" inaktiviert wird. Um diese Frage entscheiden zu können, müßten die Bedingungen, unter denen das Enzym in der lebenden Zelle seine Funktion ausfüllt, erforscht werden. Bisher aber ist nur bekannt, daß die Sulfatase A in den Lysosomen lokalisiert ist (10). Ihr physiologisches Milieu, der Ort ihres Eingreifens und die physikalisch-chemische Form, in der ihr Substrat vorliegt, sind noch ungeklärt.

D. METHODIK UND BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Es wurden, soweit nicht anders angegeben, p.a. Chemikalien der Firma Merck, Darmstadt, verwendet.

D I. Anreicherung der Sulfatase A

Die Sulfatase A wurde zunächst aus menschlichen Nieren, später aus menschlichen Lebern isoliert. Die Organe wurden nicht später als 24 h post mortem dem Körper entnommen, sofort bei -20°C tiefgefroren und nach Bedarf aufgearbeitet. Der Aufarbeitungsgang war für beide Organe der gleiche; er gliederte sich in 7 Schritte, die alle bei $2-4^{\circ}\text{C}$ durchgeführt wurden:

- 1) Die Organe wurden aufgetaut und zerschnitten, wobei die marknahen Anteile der Niere entfernt wurden. Anschließend wurden sie pro kg in 3 l 0,2 M Natriumacetat-Puffer, pH 4,5, im Starmix zerkleinert und dann mit Hilfe eines Ultra-Turrax (Janke und Kunkel, Staufen) homogenisiert. Nach Zugabe von n-Butanol und 4 M Calciumchlorid-Lösung (jeweils 300 ml auf 3 l Puffer) wurde das Homogenat 24 h gerührt und dann bei $17\,000 \cdot g$ 30 min zentrifugiert. Pro kg Organ wurden so etwa 4 l Extrakt gewonnen.
- 2) 4 l Extrakt wurden unter Rühren langsam mit 2 l Aceton (DAB 6, Merck, Darmstadt) (-18°C) versetzt und das Gemisch 1 h gerührt. Anschließend wurde wie oben zentrifugiert und der Überstand in der gleichen Weise mit 4 l Aceton versetzt. Der Niederschlag, der sich zwischen 33% und 66% (Vol./Vol.) Aceton gebildet hatte, wurde durch eine Durchflußzentrifugation nach dem System von Szent-Györgyi und Blum (Servall, Norwalk, USA) bei $25\,000 \cdot g$ und einem Durchlauf von 20 ml/min abgetrennt, in 100 ml 0,2 M Natriumacetat-Puffer, pH 4,5, suspendiert und gerührt. Nach einer weiteren Zentrifugation ($25\,000 \cdot g$, 30 min) wurden etwa 100 ml Überstand gewonnen.
- 3) In 100 ml des oben beschriebenen Überstandes wurden 28 g Ammonsulfat gelöst, so daß sich eine Ammonsulfat-Lösung mit 45%iger Sättigung ergab. Nach 24 h Stehen wurde der Niederschlag abzentrifugiert ($25\,000 \cdot g$, 30 min), in 20 ml 0,2 M Tris-Salzsäure-Puffer, pH 8 (Tris = Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Boehringer, Mannheim) suspendiert und gegen den gleichen Puffer dialysiert. Anschließend wurde vom Ungelösten abzentrifugiert ($25\,000 \cdot g$, 30 min) und mit Tris-Salzsäure-Puffer auf 30 ml aufgefüllt.

4) Die Proteinlösung wurde in Portionen von je 10 ml über eine Sephadex G 200-Säule (Pharmacia, Uppsalla, Schweden; Säulendimensionen: $74 \cdot 3,5$ cm) chromatographiert. Die Säule war mit einem 0,2 M Tris-Salzsäure-Puffer, pH 7,5, gespült worden und wurde mit dem gleichen Puffer in 10 ml Fraktionen eluiert. Das Enzym wurde als scharfer Peak um Fraktion Nr. 39 eluiert. Die Fraktionen mit einer spezifischen Aktivität größer als 2 U/mg wurden gesammelt, gegen 1%ige Glycin-Lösung (Gew./Vol.) dialysiert und durch Ultrafiltration in Kollodiumhülsen (Sartorius, Göttingen) auf 100 ml eingeengt.

5) Diese Lösung wurde nach der Vorschrift von Vesterberg und Svensson (93) in einer LKB 8 102 Fokussiersäule (LKB-Produkter AB, Bromma, Schweden) im Saccharose-Gradienten (DL Saccharose, DAB 7, Merck, Darmstadt) elektrofokussiert. Die Säulenlösung enthielt 0,1% Triton X-100 (pract., Serva, Heidelberg). Zur Ausbildung des pH-Gradienten dienten 5,2 g LKB-Trägerampholyte des pH-Bereiches 3-10 (LKB-Produkter AB, Bromma, Schweden). Die Spannung wurde im Laufe der ersten 16 h langsam auf 800 V gesteigert, wobei die Stromstärke 6 mA nicht überschritt. Nach etwa 40 h stellte sich eine konstante Stromstärke von 2,4 mA bei 800 V ein. Die Fokussierung wurde nach etwa 70 h beendet und der Säulinhalt in 3 ml Fraktionen fraktioniert. Der pH-Wert der Fraktionen wurde mit einem Mikro-pH-Meter, Typ PHM 260 (Radiometer, Kopenhagen, Dänemark), bei 20°C bestimmt. Fraktionen mit einer spezifischen Aktivität von über 2 U/mg wurden gesammelt und gegen 0,2 M Natriumacetat, pH 4,5, dialysiert.

6) Die Enzymlösung wurde als nächstes in Portionen von 10 ml über die unter 4) beschriebene Sephadex G 200-Säule chromatographiert, die zuvor mit einem 0,2 M Natriumacetat-Puffer, pH 4,5, der 0,1% Triton X-100 (Vol./Vol.) enthielt, gespült worden war und mit dem gleichen Puffer in 10 ml Fraktionen eluiert wurde. Das Enzym erschien als scharfer Peak um Fraktion Nr. 28. Fraktionen mit einer spezifischen Aktivität von über 8 U/mg wurden gesammelt, extensiv gegen 0,005 M Tris-Salzsäure-Puffer, pH 8,0, dialysiert und durch Ultrafiltration in Kollodiumhülsen auf 30 ml eingeengt.

7) Die Enzymlösung wurde anschließend an DEAE-Cellulose (DE 52, Whatman, Maidstone, England) chromatographiert. Zu diesem Zweck wurde eine Ionenaustauschersäule ($38 \cdot 3,5$ cm) mit 0,005 M Tris-Salzsäure-Puffer, pH 8, äquilibriert. Nach Auftragen der Enzymlösung wurde zunächst zur Entfernung des Triton X-100 mit drei Säulenvolumina des Ausgangspuffers gespült und dann mit

einem linearen Gradienten aus 700 ml Ausgangspuffer, der zusätzlich 0,6 M Natriumchlorid enthielt, in 15 ml Fraktionen eluiert. Das Enzym erschien als scharfer Peak um Fraktion Nr. 32. Fraktionen mit einer spezifischen Aktivität von über 27 U/mg wurden gesammelt, 6mal 2 h gegen 2 l destilliertes Wasser dialysiert und in Kollodiumhülsen auf 10 ml eingengt.

Elektrophorese der nach dem 7. Reinigungsschritt erhaltenen Enzymlösung an 7,5% Standard Gel (Canal. Co., Bethesda, Md., USA) in Tris-Glycin-Puffer (pH 8,3, $I = 0,005$) bei einer Stromstärke von 5 mA und 1 h Dauer zeigte keine größeren Verunreinigungen. Nach Anfärben des Gels mit Amido-Schwarz (Merck, Darmstadt) war nur eine Proteinbande, in der auch die enzymatische Aktivität lokalisiert war, zu erkennen. Die Lokalisation der enzymatischen Aktivität wurde durch Inkubation des Gels in der Substratlösung nach Baum et al. (40) und anschließendes kurzes Eintauchen in 1 M Natronlauge bestimmt.

Die Enzymlösung wurde abschließend mit destilliertem Wasser auf eine Proteinkonzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt, in Portionen von 200 μl aufgeteilt und bei -20°C aufbewahrt.

D II. Inkubationsbedingungen zur Bestimmung der Arylsulfatase-Aktivität

D II 1. Substratlösung

Als Ausgangslösung des Substrates diente eine 40 mM Lösung von 2-Hydroxy-5-nitrophenylsulfat (Nitrocatecholsulfat, NCS) (Sigma Chem. Corp., St. Louis, USA) in destilliertem Wasser, die mit der Säure des Inkubationspuffers bei 21°C auf den Inkubations-pH titriert worden war. Die Säuremenge, die zu dieser Titration benötigt wurde, war gering im Vergleich zur Pufferstärke im Inkubationsansatz, ihr Effekt auf die Pufferstärke wurde daher vernachlässigt.

D II 2. Pufferlösungen

Mit Ameisen-, Essig-, Propion- bzw. Salzsäure bei 21°C auf den Inkubations-pH titrierte 1,6; 0,8; 0,4; 0,2; 0,1 und 0,05 M Lösungen von Natriumformiat, -acetat, -propionat bzw. Imidazol-Salzsäure in destilliertem Wasser waren die Ausgangslösungen der Inkubationspuffer.

D II 3. Weitere Zusätze zum Inkubationsansatz

In einigen Fällen wurden Arylsulfatase-Aktivitäten in Gegenwart von Natriumchlorid oder Natriumsulfat bestimmt. Für diese Inkubationen wurden Ausgangslösungen von 0,16 M bzw. 1,6 M Natriumchlorid und 0,1 M Natriumsulfat hergestellt.

D II 4. Inkubation zur Bestimmung des Umsatzes nach einer bestimmten Inkubationszeit

Zur Inkubation wurden die zum Versuch erforderliche Enzymmenge (5 μ l bis 25 μ l) und 200 μ l der jeweiligen Pufferlösung mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 300 μ l aufgefüllt.

Zur Bestimmung der Hemmkonstante von Natriumsulfat wurden 25 μ l der Enzymlösung, 5 bis 100 μ l der 0,1 M Natriumsulfatlösung, 100 μ l der 1,6 M Natriumformiatlösung und destilliertes Wasser zu einem Volumen von 300 μ l zusammengegeben.

Parallel zu diesen Ansätzen wurden Substratlösungen vorbereitet, in denen die Konzentration an Nitrocatecholsulfat das 4-fache der im Inkubationsansatz erforderlichen Konzentration betrug.

Beide Lösungen wurden 5 min bei 37°C vorinkubiert, dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 μ l der Substratlösung zur Lösung des Enzyms im Puffer gestartet. Nach Inkubationszeiten zwischen 1 und 10 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 μ l 1 M Natronlauge zum Inkubationsansatz beendet.

D II 5. Inkubation zur Bestimmung der Zeit-Umsatz-Kurve

Das 15-fache der oben angegebenen Volumina wurde zur Bestimmung der Zeit-Umsatz-Kurve inkubiert. Aus diesen Inkubationsansätzen wurden nach Beginn der Reaktion in bestimmten Zeitabschnitten (0,5 bis 20 min) 500 μ l entnommen und sofort in 500 μ l 1 M Natronlauge gegeben. Der Inkubationsansatz zur Untersuchung des Einflusses von Natriumchlorid enthielt pro 6 ml Gesamtvolumen 3 ml 0,6 bzw. 1,6 M Natriumchloridlösung.

Zur Bestimmung des Effektes von Natriumsulfat auf die Zeit-Umsatz-Kurve wurde dem Inkubationsansatz nach Entnahme von 4 Proben von je 0,5 ml 400 μ l der Natriumsulfatlösung zugesetzt, so daß die Sulfat-Konzentration im verbleibenden Ansatz etwa 10 mM war. Durch diesen Zusatz wurden die Enzym-, Substrat- und Pufferkonzentrationen um 11% erniedrigt. Diese Änderung der Konzentrationen brauchte jedoch nicht berücksichtigt werden, da sie in allen miteinander zu vergleichenden Inkubationsansätzen in gleicher Weise erfolgte.

D II 6. Inkubationen zur Bestimmung der Arylsulfatase-Aktivität in Gegenwart von Cerebrosidsulfat

Zur Bestimmung der Arylsulfatase-Aktivität in Gegenwart von Cerebrosidsulfat wurde die Cerebrosidsulfat-Lösung in Benzol-Äthanol (2 : 1) in den Inkubationsgefäßen eingedampft, über Nacht im Vakuumexsiccator über Paraffin getrocknet und anschließend in 100 μ l der angewendeten Pufferlösung mit Hilfe eines Sonifiers, Typ LS-75 (Branson Inst., Stamford, Conn., USA) in der höchsten Leistungsstufe durch Ultraschall dispergiert. Diese Lösung wurde, ebenso wie die anderen zur Inkubation notwendigen Lösungen, 5 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit der entsprechend verdünnten Enzymlösung auf 300 μ l aufgefüllt, und die Arylsulfatase-Reaktion wurde unmittelbar darauf durch Zugabe von 100 μ l der Nitrocatecholsulfat-Lösung gestartet.

Zur Untersuchung des Einflusses von Cerebrosidsulfat auf die Zeit-Umsatz-Kurve der Arylsulfatase-Reaktion wurde die entsprechende Menge an Cerebrosidsulfat in 3 ml der Pufferlösung dispergiert und nach Vorinkubation mit 2,25 ml destilliertem Wasser und Enzymlösung aufgefüllt. Die Arylsulfatase-Reaktion wurde sofort bzw. nach 30 min durch Zugabe von 0,75 ml der entsprechenden Nitrocatecholsulfat-Lösung gestartet.

Die Beendigung der Inkubation bzw. die Probeentnahmen erfolgten wie oben beschrieben.

D II 7. Kontrolle der pH-Werte im Inkubationsansatz; Abmessung der Volumina

Der pH-Wert der Inkubationsansätze wurde in Parallelversuchen vor und nach der Inkubation, jedoch vor Zugabe der Natronlauge, bei 21°C im Mikro-pH-Me-

ter überprüft. Er wich in keinem Fall um mehr als 0,02 Einheiten vom angegebenen Wert ab.

Zur Abmessung der Volumina dienten bis 50 μl Hamilton-Präzisionsspritzen (Hamilton, Den Haag, Niederlande) von 50 bis 500 μl nachgeechte Eppendorf-Pipetten (Eppendorf, Hamburg) und über 500 μl geeichte Glaspipetten (Brand, Wertheim).

D II 8. Bestimmung des Umsatzes an Substrat

Das freigesetzte Nitrocatechol ist im Gegensatz zu Nitrocatecholsulfat bei alkalischen pH-Werten rot gefärbt. Seine Konzentration in den Proben wurde colorimetrisch mit einem Zeiss PMQ II-Spektrophotometer (Carl Zeiss, Wetzlar) bei einer Wellenlänge von 515 nm bestimmt. Bei dieser Wellenlänge beträgt die spezifische Extinktion des Nitrocatechol im alkalischen Bereich 12 400. Nitrocatecholsulfat und die anderen Bestandteile des Inkubationsansatzes stören die Bestimmung nicht.

D II 9. Inkubation nach Baum et al. (40)

Die Substratlösung enthielt in diesem Fall 10 mM/l Nitrocatecholsulfat; 0,05 mM/l Natriumpyrophosphat; 10% Natriumchlorid (Gew/Vol) und 0,5 M/l Natriumacetat; ihr pH war 5,0. 200 μl dieser Lösung wurden 5 min bei 37°C mit 200 μl der gegen Wasser dialysierten Enzympräparation inkubiert. Die Inkubation und ihre Auswertung erfolgten wie oben beschrieben.

D II 10. Abweichungen von den Mittelwerten

Die im Hauptteil angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 4 Bestimmungen. Der mittlere Fehler der Mittelwerte der Einzelbestimmungen betrug in der Regel 1,8%, der mittlere Fehler, der aus der doppelt reziproken Zeit-Umsatz-Kurve berechneten $U_{\max}$ -Werte 4,3%, der V_o -Werte 4,8% und der $t_{1/2}$ -Werte 6,2%. Bei sehr geringen Umsätzen erhöhten sich diese Fehler auf 7,2% für den $U_{\max}$ -Wert, 8,0% für den V_o -Wert und 12,3% für den $t_{1/2}$ -Wert.

D III. Abschätzung des Molekulargewichtes der Sulfatase A bei pH 4,5 und 7,5

5 g Sephadex G 200 superfine (Pharmacia, Uppsala, Schweden) wurde in 500 ml 0,1 M Natriumacetat-Puffer, pH 4,5, beziehungsweise 0,1 M Imidazol-Salzsäure-Puffer, pH 7,5 aufgeschwemmt und 24 Stunden bei 20°C langsam gerührt. Das gequollene Gel wurde abfiltriert und als gelatinöser Brei mit einem Streichgerät (Boehringer, Mannheim) in 0,5 mm Schichtdicke auf eine Glasplatte (20 x 20 cm) aufgetragen. Die Platte wurde über Nacht mit den entsprechenden Puffern äquilibriert. Anschließend wurden 3 cm vom oberen Plattenrand und mit einem Abstand von 2 cm untereinander je 3 µl einer 1%igen Lösung von Eichproteinen der Firma Boehringer, Mannheim (Chymotrypsinogen A, MG 25 000; Albumin aus Hühnerei, MG 24 000; Rinderserum-Albumin, MG 67 000; Aldolase, MG 147 000; Katalase, MG 240 000) im entsprechenden Puffer aufgetragen. An drei Auftragstellen dazwischen wurden je 5 µl der Enzymlösung im entsprechenden Puffer (5 U/ml) und an jeder Auftragsstelle zusätzlich 1 µl einer 1%igen Lösung von Cytochrom C (MG 13 500) aufgetragen. Die Platte wurde in einem Chromatographiergerät (Boehringer, Mannheim) unter einem Winkel von 25-30° absteigend mit 0,2 M Natriumacetat (pH 4,5) bzw. Imidazol-Salzsäure-Puffer (pH 7,5) chromatographiert. Nach etwa 3 Stunden war das Cytochrom C etwa 5 cm gewandert. Die Chromatographie wurde dann abgebrochen und von der Platte ein Papierabklatsch (Whatman, Maidstone, England) gemacht. Die Enzymbahnen wurden herausgeschnitten und in 0,5 cm breite Streifen zerteilt, die sofort für 30 min mit der Substratlösung nach Baum et al. (40) inkubiert wurden. Das Maximum der enzymatischen Aktivität zeigte die Wanderungsstrecke der Sulfatase A an. Der Papierabklatsch der Eichproteine wurde getrocknet und mit einer 0,06%igen Lösung von diaotierter Sulfanilsäure in 10%iger Natriumcarbonatlösung angefärbt.

D IV. Untersuchung zur Beständigkeit der Sulfatase A im pH-Bereich zwischen 3,4 und 7,5

2 µg der gereinigten Enzymfraktion wurden in 500 µl destilliertem Wasser und 500 µl 1,6, 0,8 und 0,2 M Natriumformiat Puffer verschiedener pH-Werte bei 37°C inkubiert. In Fällen, in denen der Einfluß von Albumin oder Triton X-100 auf die Stabilität des Enzyms geprüft werden sollte, enthielt die Lösung außerdem 0,5 mg/ml Albumin (Cohn Fr. V, Serva, Heidelberg) bzw. 0,1% Triton

X-100. In bestimmten Zeitabständen wurden 200 µl dieser Lösung entnommen und sofort in 200 µl einer vorbereiteten und 5 min vorinkubierten Substratlösung gegeben. Die Substratlösung war 5 mM in Bezug auf Nitrocatecholsulfat, 1 M in Bezug auf Natriumformiat und enthielt soviel Natronlauge bzw. Ameisensäure, daß der aus Substrat und gepufferter Enzymlösung bestehende Ansatz einen pH-Wert von 5,3 ($\pm 0,1$) zeigte. Dieser Ansatz wurde 5 min inkubiert und die Restaktivität des Enzyms wie oben beschrieben spektrophotometrisch bestimmt.

D V. pH-Profil der Reaktion des durch Sulfat reaktivierten Enzyms

Je 10 µg Sulfatase A wurden in 0,1 M Natriumformiat pH 5,65 bei 5 mM Substratkonzentration 10 min inkubiert. Entsprechend der Zeit-Umsatz-Kurve ist das Enzym dann weitgehend inaktiviert. Anschließend wurde der ganze Inkubationsansatz (0,5 ml) bei 2°C 24 h gegen 3 Wechsel von je 3 l destillierten Wassers dialysiert. Anschließend wurden die Ansätze bei 5 mM Substratkonzentration in 0,4 M Natriumformiat bzw. Imidazol-Salzsäure-Puffern verschiedener pH-Werte inkubiert. Nach 3 min wurden zur Überprüfung der Restaktivität des Enzyms Proben entnommen und den Inkubationsansätzen sofort danach 275 µl 1 M Natriumsulfat-Lösung zugegeben. (Sulfat-Konzentration im Inkubationsansatz: etwa 10 mM). Weitere Proben wurden nach 10, 15, 20 und 30 min entnommen. Das Volumen der Inkubationsansätze war 3 ml.

Die Restaktivität des inaktivierten Enzyms betrug etwa 20% der Ausgangsaktivität, die Zeit-Umsatz-Kurve verlief nach Zugabe der Natriumsulfat-Lösung linear.

D VI. Das Substrat zur Bestimmung der Cerebrosidsulfatase-Aktivität

D VI 1. Isolierung von Cerebrosidsulfat aus Rinderhirnen

Frische Rindergehirne wurden mit einem Ultra-Turrax (Janke und Kunkel, Staufen) in Chloroform/Methanol (2 : 1) homogenisiert und filtriert. Das Filtrat wurde mit 10%iger Natriumchlorid-Lösung einer Folch-Verteilung unterworfen (53). Die Unterphase, die sämtliche Lipide bis auf die Ganglioside enthielt, wurde einrotiert und der verbleibende Lipidextrakt über Calciumchlorid im Hochvakuum getrocknet.

Die Abtrennung der Phosphatide erfolgte durch Säulenchromatographie an aktiviertem Florisil (Floridin Co., Pittsburgh, USA) mit Chloroform/Methanol (2 : 1) als Eluatiionsmittel. Das Eluat enthielt Cholesterin, die Cerebroside und die Cerebrosidsulfate (54).

Zur weiteren Auftrennung wurde das Lipidgemisch über Säulen von entaktiviertem Florisil oder Magnesiumsilicat Woelm, Aktivitätsstufe IV, (Woelm, Eschwege) chromatographiert. Eluiert wurde mit Chloroform/Methanol/Wasser-Gemischen mit steigendem Methanol und Wasser-Gehalt (54).

Die isolierten Cerebrosidsulfate, die noch etwa 6% Cerebroside enthielten, wurden in einem dunklen Vakuumexsiccator über Calciumchlorid aufbewahrt.

D VI 2. Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Cerebrosid und Cerebrosidsulfat

Zur Trennung wurden die Proben entweder in Chloroform/Methanol (2 : 1), in Benzol/Äthanol (2 : 1), oder, nach der enzymatischen Inkubation, in wäßriger Lösung, als 2 cm breite Streifen auf Kieselgel-Fertigplatten (Merck, Darmstadt) aufgetragen. Die Lösungsmittel wurden mit einem heißen Föhn abgedampft, und die Platten nach dem Abkühlen mit Chloroform/Methanol/Wasser (80 : 20 : 3) als Laufmittel entwickelt. Die Laufzeit betrug etwa 150 min. Das Chromatogramm wurde entweder mit einem Riodünnschichtscanner Typ II (Berthold, Wildbad) oder nach Anfärben mit dem Sprühreagenz nach Kägi-Miescher (58) oder mit Eisessig/konzentrierter Schwefelsäure (50 : 1) (94) mit Hilfe eines Chromoscans (Joyce-Loebl, Gateshead, England) ausgewertet.

D VI 3. Lösungsmittel für die katalytische Addition von Tritium an Cerebrosidsulfat

Zwar lösen Cerebrosidsulfate sich gut in Gemischen aus Chloroform und Methanol, doch sind solche Lösungsmittelsysteme für die katalytische Addition von Tritium ungeeignet, da in Gegenwart von Platinkatalysatoren Chloroform unter Bildung von Chlorwasserstoff hydriert und der acide Wasserstoff des Alkohols ausgetauscht wird. Um ein protonenfreies, für die katalytische Hydrierung geeignetes Lösungsmittel zu finden, wurde die Löslichkeit von Cerebrosidsulfaten in Aceton, Diäthyläther, Tetrahydrofuran, Dioxan, Essigester,

Benzol, Cyclohexan, Hexan, Dimethylformamid und Gemischen dieser Lösungsmittel (1 : 1) geprüft. Das Lipid ging lediglich in Dimethylformamid-haltigen Systemen in Lösung. Dimethylformamid setzt die Wirksamkeit von Platinkatalysatoren etwas herab (57), daher wurde die Addition des Tritiums an die Cerebrosidsulfate in Dimethylformamid/Benzol (1 : 3), das sich in Vorversuchen mit nachgereinigtem Wasserstoff (Linde, München) am besten bewährt hatte, durchgeführt.

D VI 4. Katalytische Addition von Tritium an die Doppelbindungen des Cerebrosidsulfates

160 mg Cerebrosidsulfate wurden in 5 ml Dimethylformamid/Benzol (1 : 3) gelöst und mit 150 mg Platindioxyd versetzt. Das Reaktionsgefäß wurde an eine Hydrierapparatur nach Sandhoff (55) angeschlossen und mit Aceton-Trockeneis gekühlt, um den Dampfdruck des Lösungsmittels herabzusetzen. Dann wurde die Apparatur auf 10^{-2} Torr evakuiert, mit nachgereinigtem Stickstoff (Linde, München) belüftet und auf diese Art noch dreimal mit Stickstoff gespült. Anschließend wurde der Kapilarverschluß der Tritiumampulle, die 10 Ci Tritium (NEN Chemical GmbH, Dreieichenhain) enthielt, mit einer magnetischen Kugel innerhalb der Apparatur zerbrochen und das Tritium über das Nivelliergefäß soweit wie möglich in das Reaktionsgefäß überführt. Der Reaktionsansatz wurde 17 h bei 40°C geschüttelt, anschließend filtriert und bei 60°C und Wasserstrahlvakuum am Rotavapor eingeengt. Der braune, ölige Rückstand wurde in Chloroform/Methanol (2 : 1) aufgenommen.

D VI 5. Reinigung des tritierten Cerebrosidsulfates und Reinheitskontrolle

Das nach der Hydrierung erhaltene Produkt wurde dreimal in Chloroform/Methanol (2 : 1) aufgenommen und eingedampft. Danach wurde es durch dreimalige Säulenchromatographie an entaktiviertem Florisil in 3 mg Cerebroside, 35 mg Nicht-Hydroxy-Fettsäure- und 24 mg -Hydroxy-Fettsäure-Cerebrosidsulfat aufgetrennt. Die Ausbeute betrug 37%. Für die weiteren Versuche und die Bestimmung der Cerebrosidsulfatase-Aktivität des Enzyms wurde nur das Nicht-Hydroxy-Fettsäure-Cerebrosidsulfat verwendet.

Zur Kontrolle der radiochemischen und chemischen Reinheit wurden 20 µg Cerebrosidsulfat dünnschichtchromatographiert, unter einem Radiodünnschicht-scanner geprüft und angefärbt (94). Die Anfärbung zeigte keine sichtbaren Verunreinigungen, die radiodünnschichtchromatographische Auswertung Verunreinigungen von unter 0,1%. Das Präparat wurde als 0,185 mM Lösung in Benzol/Äthanol (2 : 1) im Kühlschrank aufbewahrt.

D VI 6. Bestimmung der spezifischen Radioaktivität

1 mg Cerebrosidsulfat wurde in 5 ml Chloroform/Methanol (2 : 1) gelöst. Von dieser Lösung wurden 25, 50 und 75 µl (entsprechend 5, 10 und 15 µg Cerebrosidsulfat) am Start auf die Dünnschichtplatte aufgetragen. Zwischen die Proben wurden gleiche Mengen gleich konzentrierter Cerebrosidsulfatlösung aufgetragen, die nach Wäßle (95) standardisiert worden war. Die Chromatogramme wurden angefärbt und mit einem Densitometer ausgewertet (95).

Nachdem so die Konzentrationen der Cerebrosidsulfatlösung kontrolliert worden waren, wurden sie auf das 10-fache verdünnt und 10 bis 40 µl dieser Lösung in Zählgläschen mit 10 ml Scintillationslösung pipettiert. Die Scintillationslösung bestand aus Toluol, das 0,03% Dimethyl-p-bis-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)-benzol, 0,5% 2.5-Diphenyloxazolol und 4% Tixotropic-Gel-Powder (Packard Instruments, La Grange, USA) enthielt (96). Die Aktivität in den Gläschen wurde in einem Tri-Carb-Scintillationszähler (Packard Instruments, La Grange, USA) bestimmt. Anschließend wurden 100 µl Tritium-Toluol (T-Toluol, Packard Instruments, $2,74 \times 10^6$ dpm/g) in die Zählgläschen gegeben und die dann darin enthaltene Aktivität wieder bestimmt.

Die Auswertung ergab eine spezifische Aktivität von 540 mCi pro mMol Cerebrosidsulfat.

D VI 7. Sitz der Markierung im Gesamtmolekül des Cerebrosidsulfates

25 µg markierten und 2,5 mg unmarkierten Cerebrosidsulfates wurden mit 1 ml Methanol/konzentrierter Schwefelsäure (10 Vol. : 1 Gew.) 15 h im zuge-schmolzenen Glasröhrchen in siedendem Äthanol erhitzt (59). Nach dem Erkalten wurden 1 ml destilliertes Wasser hinzugefügt, die Fettsäuremethylester mit 4,5 ml Petroläther ausgeschüttelt, die wäßrige Lösung mit Kalilauge alkalisch

gemacht und die Sphingeninderivate dreimal mit dem gleichen Volumen Chloroform ausgeschüttelt. Die wäßrige Phase wurde anschließend mit Methanol auf 3 ml aufgefüllt, während die Petroläther- bzw. Chloroform-Phase unter Stickstoff eingedampft und mit 10 bzw. 1 ml Chloroform/Methanol (2 : 1) wieder aufgenommen wurden. Aliquote Teile dieser Lösungen wurden im Scintillationszähler auf ihre Aktivität untersucht (Tab. XI). Für die Chloroform/Methanol-Lösungen wurde dabei die oben beschriebene Zählösung verwandt, für die Methanol/Wasser-Lösung eine Mischung aus 10 ml der beschriebenen Scintillationslösung und 6 ml Äthylenglykol-monomethyläther (96).

Tabelle XI: Radioaktivität der Methanolyseprodukte des Cerebrosidsulfates

Fraktion	Vol. d. Fr.	Probe- vol.	Imp/ min	% d. Ges.- Aktivität
Fettsäure- methylester	10 ml	0,1 ml	$5,6 \cdot 10^3$	93,8 %
Sphingenin- derivate	1 ml	0,1 ml	$3,2 \cdot 10^3$	5,3 %
Galaktose u. Sulfat	3 ml	0,5 ml	$1,2 \cdot 10^3$	1,2 %

D VII. Radiodünnschichtchromatographische Analyse

D VII 1. Radiometrische Auswertung der Chromatogramme

Der Scanner zum Ausmessen der Radiodünnschichtchromatogramme, die aus der in Abs. D VI 2 beschriebenen Auftrennung von Cerebrosidsulfat und Cerebrosid resultierten, bestand aus einem Transportschlitten, der die Dünnschichtplatte mit 120, 300 oder 600 mm/h Vorschub unter dem Detektor vorbeiführte, einem fensterlosen Gasdurchflußzähler mit einer Blendenöffnung von $2 \cdot 36$ mm, einem Hochspannungsgerät für den Detektor, einem Zählratenmesser mit 7 linearen Meßbereichen von 10 bis 10^4 Imp./sec Vollausschlag und mit 4 Trägheitsstufen für RC-Zeitkonstanten von 1 bis 30 sec, und einem Schreiber (Metrawatt, Nürnberg), der die gleichen Vorschubgeschwindigkeiten wie der Schlitten besaß. Außerdem war der Meßplatz mit einem Zähl- und Zeitsteuer-

system ausgerüstet. Der Blendenschlitz des Detektors war 6 mm breiter als die Probenstreifen, er bestrich also die ganze Breite eines Chromatogramms. Folgende Meßparameter wurden während der Messung konstant gehalten: Vorschubgeschwindigkeit von Schlitten und Schreiber (300 mm/h), Gasdurchfluß (etwa 3 l/h Methan), Abstand zwischen Dünnschichtplatte und Zählrohrblende (etwa 1,5 mm), Zählrohrspannung (300 V), Eingangsempfindlichkeit des Zählratenmessers (100 mV) und RC-Zeitkonstante (10 sec). Die Empfindlichkeit wurde je nach Aktivität auf dem Chromatogramm zwischen 100 und 10 000 Imp./sec Vollauschlag variiert. Bestandteil des Meßplatzes war weiterhin ein Integrator (Berthold, Wildbad), der an einen Kompensationsschreiber (Siemens, München) angeschlossen war, und mit dem die Flächen unter dem Cerebrosid- und Cerebrosidsulfat-Peaks bestimmt wurden.

D VII 2. Fehler bei der Auswertung

Um die Fehlerbreite bei der Auswertung der Chromatogramme durch den Radiodünnschicht-Scanner zu ermitteln, wurden Gemische aus markierten Cerebrosiden, die als Nebenprodukte der Tritierung der Cerebrosidsulfate angefallen waren, und Cerebrosidsulfaten in Chloroform Methanol (2 : 1) auf Dünnschichtplatten aufgetragen und chromatographiert. Die Aktivität der Cerebrosidlösung war wie die der Cerebrosidsulfate bestimmt worden; die spezifische Aktivität der Cerebroside wurde nicht bestimmt.

Die Cerebrosid-Cerebrosidsulfat-Gemische waren so zusammengesetzt, daß die Aktivität der Cerebroside 1% bis 50% der Gesamtaktivität der Proben von 11,8 μ Ci ausmachte. 11,8 μ Ci entsprachen 21,8 nMol Cerebrosidsulfat. Die Ergebnisse (Tab. XII) resultierten aus jeweils 7 Einzelmessungen.

Tabelle XII

Bestimmung der Fehlerbreite nach Auswertung durch den Radiodünnschicht-Scanner.

% in der Probe = Prozentsatz der Radioaktivität der Cerebroside von der Gesamtaktivität der Probe. % nach Auswertung = Mittelwert des Prozentsatzes der Radioaktivität der Cerebroside von der Gesamtaktivität der Probe, der sich aus 7 Bestimmungen mit Hilfe des Radiodünnschicht-Scanners ergibt.

% in der Probe	% nach Auswertung	Maximale Abweichung (%)	Mittlerer Fehler des Mittelwertes (%)
50	50,32	7,5	2,5
20	19,88	7,9	2,8
10	10,23	15,0	4,6
5	4,85	21,7	8,3
2	1,79	38,2	11,6
1	0,82	53,6	22,4

D VIII. Inkubationsbedingungen zur Bestimmung der Cerebrosid-sulfatase-Aktivität

D VIII 1. Pufferlösungen

Als Puffer diente, wie bei der Bestimmung der Arylsulfatase-Aktivität, Natriumformiat. 0,02; 0,04; 0,08 und 0,16 M Natriumformiat-Lösungen waren mit Ameisensäure auf den Inkubations-pH titriert worden. Im Inkubationsansatz wurden sie im Verhältnis 1 zu 4 verdünnt.

D VIII 2. Zusätze zum Inkubationsansatz

Für die Untersuchung der Hemmung der Cerebrosidsulfatase-Aktivität durch Nitrocatecholsulfat und Natriumsulfat wurden Lösungen von 2 mM Nitrocatecholsulfat, mit Ameisensäure auf pH 5,3 titriert, und 0,02 M Natriumsulfat bereitet. Zur Überprüfung des Effektes von Proteinen auf die Cerebrosidsulfatase- und die Arylsulfatase-Reaktion wurden Lösungen von 0,1 mg/ml von Albumin

aus Rinderserum (Cohn Fr. V, Serva, Heidelberg), Cytochrom C aus Pferdeherz (Boehringer, Mannheim), und Globulin aus menschlichem Serum (Boehringer, Mannheim) in destilliertem Wasser hergestellt. Die Bestimmung des Einflusses von Lipiden auf die enzymatischen Aktivitäten wurde mit Lösungen von 0,1 mM D,L-Psychosin, L- α -Lecithin aus Eigelb, Sphingomyelin aus Rinderhirn, Ceramid aus Rinderhirn (alle Sigma Chem. Comp., St. Louis, Mo., USA), Inositphosphatid aus Rinderhirn (Koch-Light, Colnbrook, England) und Cerebrosid aus Rinderhirn in Chloroform/Methanol (2 : 1) durchgeführt.

D VIII 3. Inkubation zur Bestimmung der Cerebrosidsulfatase-Aktivität

Zur Inkubation wurden 5 bis 75 μ l der Substratlösung in Benzol/Äthanol (2 : 1) in den Inkubationsgefäßen eingetrocknet. In Fällen, in denen der Effekt von Lipiden auf die Cerebrosidsulfatase-Aktivität untersucht werden sollte, wurden zusammen mit 54 μ l der Substratlösung 100 μ l der jeweiligen Lipidlösung eingetrocknet. Die Rückstände wurden über Nacht im Vakuumexsiccator über Paraffin getrocknet. Anschließend wurden 25 μ l der jeweiligen Pufferlösung und, bei der Untersuchung der Inhibitorwirkungen, 25 μ l der Nitrocatecholsulfat- oder der Natriumsulfat-Lösungen, bzw., bei der Prüfung der Proteineinflüsse, 25 μ l der jeweiligen Proteinlösung zusätzlich zugegeben. Mit destilliertem Wasser wurde der Inkubationsansatz soweit aufgefüllt, daß das Gesamtvolumen nach der später zu erfolgenden Zugabe der Enzymlösung 100 μ l war. Das Substrat und, soweit vorhanden, die zusätzlichen Lipide wurden durch Ultraschallbehandlung mit einem Sonifier (1 min, höchste Leistungsstufe) dispergiert und die Inkubations- sowie die Enzymlösung 5 min unter kräftigem Schütteln bei 37°C vorinkubiert. Die Lipide wurden durch diese Ultraschallbehandlung nicht zerstört (97). Die Reaktion wurde durch Zugabe der Enzymlösung gestartet. Nach 5 min Inkubation bei 37°C wurden dem Ansatz 50 μ l entnommen, sofort mit 5 μ l 1 M Natronlauge versetzt und auf Dünnschichtplatten aufgetragen.

Zur Erstellung der Zeit-Umsatz-Kurven der Cerebrosidsulfatase-Reaktion wurde das 10fache der oben angegebenen Volumina zusammengegeben. Aus diesen Ansätzen wurden die Proben in angemessenen Zeiträumen entnommen, mit 1 M Natronlauge versetzt und auf Dünnschichtplatten aufgetragen.

Die pH-Werte der Inkubationsansätze wurden in Parallelversuchen vor und nach der Inkubation in einem Mikro-pH-Meter überprüft. Sie wichen um nicht mehr als 0,03 pH-Einheiten von den angegebenen Werten ab. Die pH-Werte nach Zugabe der Natronlauge lagen zwischen 10 und 12. Die Zugabe der Natronlauge verfälschte das Ergebnis nicht, wie Blindversuche in Abwesenheit des Enzyms zeigten.

Chromatographie und Auswertung der Dünnschichtplatten erfolgte wie in Abs. D VII beschrieben.

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Sulfatase A aus menschlichen Nieren und Lebern wurde etwa 3 800-fach angereichert. Das Molekulargewicht des Enzyms ist etwa 107 000 bei pH 7,5 und über 240 000 bei pH 4,5. Sein isoelektrischer Punkt liegt bei pH 4,6. Die Stabilität der Sulfatase A im pH-Bereich zwischen 3,4 und 7,5 wurde untersucht.
2. Für die anomale Relation zwischen Inkubationszeit und Substratumsatz, die bei der Reaktion der Sulfatase A mit 2-Hydroxy-5-nitrophenylsulfat (= Nitrocatecholsulfat) zu beobachten ist, konnte eine mathematische Beziehung aufgestellt werden, mit der sich aus der doppelt reziproken Zeit-Umsatz-Kurve der Reaktion ihre Anfangsgeschwindigkeit, ihr maximaler Umsatz und ihre Halbwertszeit bestimmen lassen.
3. Anhand dieser Beziehung wurden die Einflüsse des pH-Wertes, der Substratkonzentration und der Pufferkonzentration auf die Reaktion der nativen Sulfatase A mit Nitrocatecholsulfat untersucht. Weiterhin wurde kompetitive Hemmung der enzymatischen Aktivität der nativen Sulfatase A durch Natriumsulfat festgestellt. Das pH-Profil der reaktivierten Sulfatase A und die Wirkung der Pufferkonzentration auf ihre Reaktion wurden bestimmt.
4. Auf Grund der Ergebnisse dieser Untersuchung wurde ein Modell der Reaktion der Sulfatase A mit Nitrocatecholsulfat aufgestellt und diskutiert, mit dem die kinetischen Eigenschaften der Arylsulfatase-Reaktion erklärt werden konnten. Das Modell ist eine Erweiterung der Vorstellungen, die Baum und Dodgson (19) über diese Reaktion entwickelt haben.
5. Es wurde erstmals festgestellt, daß die Sulfatase A bei geringen Pufferstärken auch in Abwesenheit von Aktivatoren wie dem natürlichen Aktivator, Natriumcholat oder Natriumtaurodesoxycholat eine hohe Cerebrosidsulfatase-Aktivität zeigt.
6. Die Untersuchung der Wirkungen von pH-Wert, Substratkonzentration, Pufferkonzentration sowie von Lipiden und Proteinen auf die Reaktion der Sulfatase A mit Cerebrosidsulfat ergab deutliche Unterschiede zwischen der Cerebrosidsulfatase- und der Arylsulfatase-Aktivität des Enzyms.

7. Andererseits zeigten die Zeit-Umsatz-Kurve der Cerebrosidsulfatase-Reaktion und die Effekte von Cerebrosidsulfat auf die Arylsulfatase-Aktivität der Sulfatase A, daß das Enzym bei der Reaktion mit seinem natürlichen Substrat in ähnlicher Weise inaktiviert wird wie bei der Reaktion mit Arylsulfaten.
8. Daraus wurde geschlossen, daß beide Reaktionen nach einem ähnlichen Mechanismus ablaufen. Die Unterschiede in den kinetischen Eigenschaften der Cerebrosidsulfatase- und der Arylsulfatase-Reaktion der Sulfatase A wurden auf Unterschiede in der Struktur der beiden Substrate zurückgeführt.

F. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) D. Robinson, B. Spencer und R. T. Williams;
Biochem. J., 48 (1951) XXVII
- 2) K. S. Dodgson und B. Spencer;
Rep. Progr. Chem., 53 (1957) 318
- 3) A. B. Roy; Biochem. J., 68 (1958) 519
- 4) K. S. Dodgson und F. A. Rose;
in "Metabolic Conjugation and Metabolic Hydrolysis",
Herausg.: W. H. Fishman, Bd. I, S. 239, Academic Press,
New York, 1970
- 5) A. B. Roy und P. A. Trudinger;
"The Biochemistry of Inorganic Compounds of Sulphur"
Cambridge Univ. Press, London und New York, 1970
- 6) A. A. Farooqui und B. K. Bachhawat;
J. Neurochem., 18 (1971) 635
- 7) J. O. Dolly, K. S. Dodgson und F. A. Rose;
Biochem. J., 128 (1972) 337
- 8) D. W. Milsom, F. A. Rose und K. S. Dodgson;
Biochem. J., 109 (1968) 40P
- 9) D. W. Milsom, F. A. Rose und K. S. Dodgson;
Biochem. J., 128 (1972) 331
- 10) R. Viala und R. Gianetto;
Can. J. Biochem. Physiol., 33 (1955) 839
- 11) J. Gniot-Szulzycka und M. Komsoszynski;
Acta Biochim. Polon., 17 (1970) 185
- 12) J. Gniot-Szulzycka; Acta Biochim. Polon., 19 (1972) 181
- 13) B. C. Harinath und E. Robins;
J. Neurochem., 18 (1971) 245
- 14) K. Harzer, K. Stinshoff, W. Mraz und H. Jatzkewitz;
J. Neurochem., 20 (1973) 279

- 15) R. G. Nicholls und A. B. Roy;
in "The Enzymes", 3. Ausg., Bd. V, S. 27-38, Academic Press Inc.,
New York und London, 1971
- 16) W. Bleszynski, A. Leznicki und J. Lewosz;
Enzymol., 37 (1969) 314
- 17) A. B. Roy; Biochim. Biophys. Acta, 227 (1971) 129
- 18) K. S. Dodgson, B. Spencer und C. H. Wynn;
Biochem. J., 62 (1956) 500
- 19) H. Baum und K. S. Dodgson; Biochem. J., 69 (1958) 573
- 20) D. A. Stumpf und J. H. Austin;
Trans. Amer. Neurol. Ass., 97 (1972) 29
- 21) J. Jatzkewitz;
Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem., 311 (1958) 279
- 22) J. H. Austin; Trans. Amer. Neurol. Assoc., 83 (1958) 149
- 23) H. Jatzkewitz; Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 320 (1960) 134
- 24) A. Résibois; Path. europ., 6 (1971) 278
- 25) J. H. Austin, A.S. Balasubramanian, T.N. Pattabiraman,
S. Saraswathi, D. K. Basu und B. K. Bachhawat;
J. Neurochem., 10 (1963) 805
- 26) E. Mehl und H. Jatzkewitz;
Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem., 331 (1963) 292
- 27) E. Mehl und H. Jatzkewitz;
Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem., 339 (1964) 260
- 28) E. Mehl und H. Jatzkewitz;
Biochim. Biophys. Acta, 151 (1968) 619
- 29) H. Jatzkewitz und K. Stinshoff;
FEBS-Letters, 32 (1973) 129
- 30) H. Jatzkewitz und E. Mehl; J. Neurochem., 16 (1969) 19
- 31) A. K. Percy, D. F. Farrell und M. M. Kaback;
J. Neurochem., 19 (1972) 233

- 32) M. T. Porter, A. L. Fluharty, J. Trammell und H. Kihara;
Biochem. Biophys. Res. Commun., 44 (1971) 660
- 33) A. Jerfy und A. B. Roy;
Biochim. Biophys. Acta, 293 (1973) 178
- 34) M. T. Porter, A. L. Fluharty, S. D. de la Flor und H. Kihara;
Biochim. Biophys. Acta, 258 (1972) 769
- 35) B. Spencer; Biochem. J., 69 (1958) 155
- 36) H. Lineweaver und D. Burk;
J. Ann. Chem. Soc., 56 (1934) 658
- 37) A. B. Roy; Biochem. J., 55 (1953) 653
- 38) H. Baum, K. S. Dodgson und B. Spencer;
Biochem. J., 69 (1958) 568
- 39) R. G. Nicholls und A. B. Roy;
Biochim. Biophys. Acta, 242 (1971) 141
- 40) H. Baum, K. S. Dodgson und B. Spencer;
Clin. Chem. Acta, 4 (1959) 453
- 41) H. Jatzkewitz; in "Current Trends in the Biochemistry of Lipids",
Herausg.: R. M. S. Smellie, S. 141 - 150,
Academic Press, New York, 1973
- 42) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr und R. J. Randall;
J. Biol. Chem., 193 (1951) 265
- 43) O. Warburg und W. Christian; Biochem. Z., 310 (1941) 384
- 44) L. W. Nichol und A. B. Roy; J. Biochem., 55 (1964) 643
- 45) W. Bleszynski; Enzymol., 32 (1967) 169
- 46) L. W. Nichol und A. B. Roy; Biochem., 4 (1965) 386
- 47) E. Neuwelt, D. Stumpf, J. H. Austin und P. Kohler;
Biochim. Biophys. Acta, 236 (1971) 333
- 48) J. Jaworek; Chromatographia, 2 (1969) 289
- 49) A. S. Balasubramanian und B. K. Bachhawat;
J. Neurochem. 10 (1963) 201

- 50) J. L. Breslow und H. R. Sloan;
Biochem. Biophys. Res. Commun., 46 (1972) 919
- 51) M. Dixon und E. C. Webb; in "Enzymes", S. 179, Longmans,
Green and Co., London, 1959
- 52) A. B. Roy; Experientia, 13 (1957) 32
- 53) J. Folch, M. Lees und G. H. Sloane-Stanley;
J. Biol. Chem. 226 (1957) 497
- 54) E. Mehl und H. Jatzkewitz; Naturwissensch., 50 (1963) 227
- 55) K. Sandhoff; Dissertation, Univ. München, 1968
- 56) E. A. Evans; "Tritium and its Compounds, Butterworths,
London, 1966
- 57) E. B. Maxted; Advances Cat. III, S. 129, Academic Press,
New York, 1957
- 58) E. Stahl und K. Kaltenbach; J. Chromatog., 5 (1961) 350
- 59) H. Thierfelder;
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 44 (1905) 366
- 60) E. Isaacson und E. A. Moscatelli;
J. Neurochem., 17 (1970) 365
- 61) M. B. Abramson, R. Katzman, R. Curci und C. E. Wilson;
Biochem., 6 (1967) 295
- 62) G. Rabitzsch; J. Chromatog., 37 (1968) 476
- 63) G. Rabitzsch; J. Chromatog., 37 (1968) 350
- 64) G. Boucke; Atompraxis, 2 (1965) 263
- 65) H. Schurfeld und L. A. Wegener; Nukleonik, 7 (1965) 74
- 66) P. H. von Hippel und K.-Y. Wong; Science, 145 (1964) 577
- 67) L. W. Nichol und A. B. Roy; Biochem., 5 (1966) 1379
- 68) W. W. Cleland; Biochim. Biophys. Acta, 67 (1963) 104, 173
- 69) A. B. Roy; Biochim. Biophys. Acta, 198 (1970) 365
- 70) R. P. J. Williams, F. L. Hoch und B. L. Vallee;
J. Biol. Chem. 232 (1958) 465

- 71) R. F. Ramley und M. O. Hudock;
Biochim. Biophys. Acta, 315 (1973) 22
- 72) F. M. Pohl; Europ. J. Biochem., 7 (1968) 146
- 73) W. P. Jencks; in "Catalysis in Chemistry and Enzymology",
McGraw-Hill, New York, 1969
- 74) J. L. Denburg und W. D. McElroy;
Arch. Biochem. Biophys., 141 (1970) 668
- 75) N. V. Thiem, G. Lacombe und N. V. Thoai;
Biochim. Biophys. Acta, 258 (1972) 422
- 76) P. L. Coleman und H. Weiner; Biochem., 12 (1973) 1706
- 77) J. C. Warren und S. G. Ceatum; Biochem., 5 (1966) 1702
- 78) M. Lazdunski, C. Petitclerc, D. Chappelet und C. Lazdunski;
Europ. J. Biochem., 20 (1971) 124
- 79) D. E. Koshland, jr.; Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., 44 (1958) 98
- 80) D. E. Koshland, jr., G. Nemethy und D. Filmer;
Biochem., 5 (1966) 365
- 81) J. Monod, J. P. Changeux und F. Jacob;
J. Mol. Biol., 6 (1963) 306
- 82) J. Monod, J. Wyman und J. P. Changeux;
J. Mol. Biol., 12 (1965) 88
- 83) C. Lazdunski und M. Lazdunski; Europ. J. Biochem., 7 (1969) 294
- 84) M. C. Carey und D. M. Small; Am. J. Med., 49 (1970) 590
- 85) P. J. Stoffyn; J. Am. Oil Chem. Soc., 43 (1966) 69
- 86) D. B. Gammack, J. H. Perrin und L. Saunders;
Biochim. Biophys. Acta, 84 (1964) 576
- 87) S. T. Thannhauser und N. F. Boncoddio; J. Biol. Chem., 172 (1948) 141
- 88) R. Öhman, A. Rosenberg und L. Svennerholm;
Biochem., 9 (1970) 3774

- 89) S. Gatt, Y. Bahrenholz, I. Borkovski-Kubiler und Z. Leibivitz-Ben Gershon; in "Sphingolipids, Sphingolipidoses and Allied Disorders", Herausg.: B. W. Volk und S. M. Aronson, S. 237, Plenum Press, New York, 1972
- 90) P. J. Quinn und W. R. Sherman; Biochim. Biophys. Acta, 233 (1971) 734
- 91) V. Lipovac, N. Barton und A. Rosenberg; Biochem., 12 (1973) 1858
- 92) M. B. Abramson und R. Katzman; Science, 161 (1968) 577
- 93) O. Vesterberg und H. Svenson; Acta chem. scand., 20 (1966) 820
- 94) K. Harzer, W. Wäßle, K. Sandhoff und H. Jatzkewitz; Z. anal. Chem., 243, (1968) 527
- 95) W. Wäßle; Dissertation, Univ. München, 1971
- 96) D. J. Prockop und P. S. Ebert; Anal. Biochem., 4 (1962) 128
- 97) M. B. Abramson, R. Katzman, R. Curci und C. E. Wilson; Biochem., 6 (1967) 295

G. LEBENSLAUF

Am 13. Juli 1940 wurde ich, Klaus Erich Stinshoff, als Sohn des Bauern Erich Stinshoff und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Brandhoff, in Dortmund geboren.

Von 1947 bis 1951 besuchte ich die Volksschule in Dortmund-Eichlinghofen, anschließend das Leibniz-Gymnasium in Dortmund, an dem ich im März 1961 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1961 immatrikulierte ich mich zum Studium der Biologie an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg, wechselte aber im folgenden Semester in die Fachrichtung Chemie über. Von November 1962 bis Februar 1965 studierte ich an der Technischen Hochschule in Clausthal, wo ich im November 1964 die Diplomvorprüfung für Chemiker ablegte. Von Mai 1965 bis Februar 1968 setzte ich mein Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München fort und bestand hier im April 1968 die Diplomhauptprüfung für Chemie.

Meine Diplomarbeit fertigte ich von Juli 1968 bis Juli 1969 in der neurochemischen Abteilung des Max-Planck-Institutes für Psychiatrie an, wo auch von August 1969 bis April 1973 unter der Aufsicht von Herrn Prof. Dr. F. Lynen und unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Jatzkewitz die vorliegende Arbeit entstand.

Im Oktober 1971 wurde mir die Stelle eines wissenschaftlichen Assistenten am Max-Planck-Institut für Psychiatrie übertragen.

